

Aus der Klinik für Urologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

Analysen synergistischer Wirkungen einer PARP-Inhibitor-basierten
Kombinationstherapie auf Cisplatin-resistente und -sensitive
Urothelkarzinomzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Anna L. Bartkowiak

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. Michèle J. Hoffmann

Zweitgutachter: Prof. Christoph V. Suschek

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Thy, S., Hommel, A., Meneceur, S., Bartkowiak, A. L., Schulz, W. A., Niegisch, G. & Hoffmann, M. J. 2021. Epigenetic Treatment of Urothelial Carcinoma Cells Sensitizes to Cisplatin Chemotherapy and PARP Inhibitor Treatment. 13, 1376.

Zusammenfassung

Zur Behandlung des fortgeschrittenen invasiven Urothelkarzinoms (UC) wird die Cisplatin-basierte Chemotherapie eingesetzt, obwohl Resistenzen gegen das Chemotherapeutikum die Therapieeffizienz häufig wesentlich beeinflussen. Die molekularen Mechanismen der Cisplatin-Resistenz sind multifaktoriell, so dass neue multikausale Kombinationsbehandlungen benötigt werden, um diese zu überwinden. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung Cisplatin-sensitiver UC-Zelllinien sowie ihrer Cisplatin-resistenten Sublinien (LTTs) auf das Ansprechen gegenüber neuer Kombinationstherapien. Als Kombinationspartner dienten zum einen epigenetische Inhibitoren, insbesondere der Bromodomänen-Proteine (BETi; PLX51107), die Histonacetylierungen erkennen und über ihre Funktion bei der Transkriptionsregulation genomweite Wirkungen entfalten. Zum anderen wurden PARP-Inhibitoren (PARPi; Olaparib und Talazoparib) als Inhibitoren der DNA-Reparatur, speziell des Reparaturwegs der nicht homologen Endverknüpfung (NHEJ), als Kombinationspartner untersucht. Durch PARPi werden Zellen stark abhängig von der homologen Rekombinationsreparatur (HR) für die Korrektur von DNA-Strangbrüchen. Ist die HR auch defizient, wie z.B. bei BRCA-mutierten Ovarialkarzinomen (*BRCAness*), zu dessen Therapie PARPi zugelassen sind, entsteht synthetische Letalität. In meist BRCA-wildtypischen UC-Zellen (UCCs) kann ein *BRCAness*-Phänotyp künstlich durch epigenetische Inhibitoren der Histonacetylierung wie z.B. PLX51107 induziert werden. Zudem wirken solche Substanzen DNA-schädigend. Hieraus ergab sich die Rationale in dieser Arbeit die Kombination von BET- und PARP-Inhibitoren auf synergistische Effekte mit Hilfe der Chou-Talalay Methode zu untersuchen. Beide PARPi wirkten mit dem BETi synergistisch in UCCs und LTTs. Durch die synergistische Wirkung waren Dosisreduktionen möglich, die besser toleriert wurden von benignen HBLAK-Zellen. Da Olaparib bereits seit mehreren Jahren für andere Tumorentitäten klinisch zugelassen ist, wurde die zelluläre und molekulare Wirkung dieser Kombination genauer untersucht. Mittels Durchflusszytometrie wurde ein Zellzyklusarrest festgestellt, auch das klonogene Wachstum über zwei Wochen war stark reduziert. Die durchflusszytometrisch nachgewiesene Apoptose-Induktion konnte über PARP-Spaltung über Western Blot Analyse verifiziert werden. Auch Genexpressionsveränderungen von Komponenten der DNA-Reparatur wurden mittels quantitativer RT-PCR bestätigt. Über *in silico*-Analysen von Transkriptomdaten wurden Kandidaten identifiziert, die für das Ansprechen auf die Inhibitoren relevant sein könnten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Kombination aus einem PARPi und einem BETi eine vielversprechende therapeutische Option für Patienten mit einem fortgeschrittenen invasiven UC sein kann, auch als Zweitlinientherapie nach erfolgter Chemotherapie. Die klinische Anwendbarkeit von PARPi könnte somit auch auf Urothelkarzinome ohne HR-Defizienz ausgedehnt werden.

Summary

Cisplatin-based chemotherapy is used for the treatment of advanced invasive urothelial carcinoma (UC), although chemoresistance often has a significant impact on treatment efficacy. The molecular mechanisms of cisplatin resistance are multifactorial, so that new multicausal combination treatments are needed to overcome them. The aim of this work was therefore to investigate cisplatin-sensitive UC cell lines and their cisplatin-resistant sublines (LTTs) for their response to new combination therapies. Epigenetic inhibitors, in particular of the bromodomain proteins (BETi; PLX51107), which recognize histone acetylation and exert genome-wide effects via their function in transcription regulation, served as combination partners. On the other hand, PARP inhibitors (PARPi; olaparib and talazoparib) were investigated as inhibitors of DNA repair, especially of the non homologous end joining repair pathway (NHEJ), as combination partners. By PARPi cells become highly dependent on homologous recombination repair (HR) for the correction of DNA strand breaks. If the HR is also deficient, e.g. in BRCA-mutated ovarian carcinomas (*BRCAness*), for whose therapy PARPi are approved, synthetic lethality occurs. In mostly BRCA-wildtype UC cells (UCCs), a *BRCAness* phenotype can be artificially induced by epigenetic inhibitors of histone acetylation such as PLX51107. In addition, such substances have a DNA damaging effect. This led to the rationale in this study to investigate the combination of BET and PARP inhibitors for synergistic effects using the Chou-Talalay method. Both PARPi acted synergistically with the BETi in UCCs and LTTs. The synergistic effect enabled dose reductions that were better tolerated by benign HBLAK cells. Since olaparib is already clinically approved for other tumour entities for many years, the cellular and molecular effects of this combination were investigated in more detail. Flow cytometry revealed cell cycle arrest and clonogenic growth over two weeks was also strongly reduced. Apoptosis induction detected by flow cytometry was verified by PARP cleavage using Western blot analysis. Gene expression changes of DNA repair components were confirmed by quantitative RT-PCR. *In silico* analyses of transcriptome data were used to identify candidates that could be relevant for the response to the inhibitors. The results of this study show that the combination of a PARPi and a BETi can be a promising therapeutic option for patients with advanced invasive UC, also as second-line therapy after chemotherapy. The clinical applicability of PARPi could thus also be extended to urothelial carcinomas without HR deficiency.

Abkürzungsverzeichnis

ADCs	Antibody-drug-conjugates/Antikörper-Wirkstoff-Konjugate
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BET	Bromodomänen
BETi	Bromodomänen-Inhibitor
BMFZ	Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Complementary DNA/komplementäre DNA
CI	Combination-Index/Kombinationsindex
Cisplatin	Cis-Diammindichlorplatin(II)
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
Cq	Quantification cycle/Quantifizierungszyklus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphate Buffered Saline
DSB/DSBs	Doppelstrangbruch/Doppelstrangbrüche
EMA	European Medicines Agency
Epidrugs	Pharmakologische Inhibitoren epigenetischer Enzyme
EV	Enfortumab-Vedotin
F	Weiblich
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FC	Fold change
FCS	Fetal calf serum/Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate conjugate
Fwd.	Forward
G	Grading
GC	Gemcitabin + Cisplatin
Glutamax	Stabilisiertes L-Glutamin
HAT	Histonacetyltransferase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HDAC	Histondeacetylase
HR	Homologe Rekombination
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitor

is	In situ
kDA	Kilodalton
LOG	Logarithmus
LTT	Long term treated cell/Cisplatin-resistente Zellen
M	Männlich
mCRPC	Metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinom
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MVAC	Methotrexat + Vinblastin + Adriamycin + Cisplatin
NER	Nucleotide excision repair/Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	Nicht homologe Endverknüpfung/non homologous end joining
ns	Nicht signifikant
PARPi	PARP-Inhibitor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PLX	PLX51107
P-TEF	positiver Transkriptions Elongationsfaktor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative real time/Echtzeit Polymerasekettenreaktion
Rev.	Reverse
RNAseq	RNA-Sequenzierung
Rpm	runs per min/Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSB/SSBs	Einzelstrangbruch (single-strand break)/Einzelstrangbrüche
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TCC	Transitional cell carcinoma
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom
TNM	Tumor node metastasis/Tumor Lymphknoten Metastasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TUR	Transurethrale Resektion
UC	Urothelkarzinom
UCC	Urothelkarzinomzelle
UICC	International Cancer Control

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Urothelkarzinom	1
1.2	Aktuelle Therapieoptionen des Urothelkarzinoms	2
1.3	Wirkungsweise von Cisplatin und Mechanismen der Resistenzentwicklung	4
1.4	Pharmakologische Inhibitoren epigenetischer Enzyme (Epidrugs) als neue Therapieoption nach erfolgter Cisplatin-Behandlung	6
1.4.1	Histondeacetylase-Inhibitoren	7
1.4.2	Bromodomäne-Inhibitoren	9
1.4.3	Der BETi der neuen Generation: PLX51107	11
1.5	Das Konzept der <i>BRCAness</i> und ihre therapeutischen Möglichkeiten	15
1.5.1	Anwendung von PARPi bei BRCA-mutierten Tumoren	16
1.5.2	Anwendung von Kombinationstherapien zur Erzeugung einer künstlichen <i>BRCAness</i> bei funktionierender HR-Reparatur	17
1.6	Ziel der Arbeit	19
2	Material	21
2.1	Zelllinien	21
2.2	Materialien für die Zellkultur	22
2.3	MTT-Test	23
2.4	Giemsa/Krystallviolett Färbung	23
2.5	RNA-Analyse	23
2.6	Protein-Analyse	25
2.7	Durchflusszytometrie	28
2.8	Allgemein verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	29
2.9	Software	29
3	Methoden	30
3.1	Zellkultur	30
3.1.1	Kultivierung und Passage der parentalen UC-Zelllinien	30
3.1.2	Kultivierung und Passage der LTT-Zelllinien	30

3.1.3	Kultivierung und Passage der Kontrollzelllinie HBLAK.....	31
3.1.4	Zellzahlbestimmung.....	31
3.1.5	Zellaussaat.....	31
3.2	MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität.....	33
3.2.1	Monotherapie und IC ₅₀ -Bestimmung.....	33
3.2.2	Kombinationstherapie und Synergieanalyse	36
3.3	Klonogenitätstest und Giemsa/ Kristallviolett Färbung	37
3.4	RNA-Analysen.....	38
3.4.1	RNA-Isolierung.....	38
3.4.2	Reverse Transkription.....	38
3.4.3	qRT-PCR.....	39
3.4.4	Auswertung der RNAseq-Daten	40
3.5	Protein-Analysen	40
3.5.1	Protein-Isolierung	40
3.5.2	BCA-Test.....	41
3.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	41
3.5.4	Western Blot.....	42
3.6	Durchflusszytometrie.....	43
3.6.1	Zellzyklusanalyse	43
3.6.2	Apoptoseanalyse	44
3.7	Statistische Auswertung.....	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Auswahl eines geeigneten PARPi für die Behandlung der UC-Zelllinien.....	46
4.2	Wirksamkeit von PARPi in Kombination mit Cisplatin	47
4.3	Auswahl eines geeigneten epigenetischen Inhibitors für die Kombination mit PARPi 50	
4.4	Dosisreduktion durch die synergistische Wirkung des PARPi und des BETi	53
4.5	Einfluss der Behandlungen auf die Langzeitproliferationsfähigkeit	58
4.6	Einfluss der Behandlungen auf den Zellzyklus	60
4.7	Einfluss der Behandlung auf die Apoptose	62

4.8	Nebentoxizität.....	67
4.9	Validierung der Wirksamkeit der Kombinationstherapie mit dem alternativem PARPi Talazoparib	71
4.10	Einfluss der Behandlung auf die Genexpression.....	74
4.11	Identifizierung möglicher Faktoren, die das PARPi-Ansprechen bestimmen	84
4.11.1	Genexpressionsunterschiede von RT-112 vs. HBLAK im Vergleich zu anderen UCCs vs. HBLAK.....	84
4.11.2	Genexpressionsunterschiede zwischen LTTs vs. parentalen UCCs.....	86
4.11.3	Expressionsunterschiede PARP-assoziiertes Gene zwischen PLX-behandelten UCCs vs. unbehandelten UCCs.....	88
5	Diskussion.....	90
5.1	Wirksamkeit der PARPi-Monotherapie	90
5.1.1	Ansprechen von UCCs und LTTs auf die PARPi-Monotherapie	90
5.1.2	Analyse möglicher Faktoren, die das Ansprechen auf PARPi beeinflussen.....	92
5.2	Wirksamkeit von Kombinationstherapien mit PARPi.....	96
5.2.1	Ansprechen der UCCs und LTTs auf die Kombination aus PARPi und Cisplatin .	96
5.2.2	Ansprechen der UCCs und LTTs auf die Kombination aus PARPi und HDACi	97
5.2.3	Ansprechen der UCCs und LTTs auf die Kombination aus PARPi und BETi	99
5.3	Nebentoxizität.....	106
5.4	Ausblick	108
6	Literaturverzeichnis.....	109
7	Anhang	122
7.1	Abbildungen.....	122
7.2	Abbildungsverzeichnis	123
7.3	Tabellenverzeichnis	126

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom

Die Harnblase ist ein im kleinen Becken gelegenes Hohlorgan und Teil der ableitenden Harnwege. Gemeinsam mit dem Nierenbecken, dem Harnleiter und der an die Harnblase anschließenden Harnröhre erfolgt der Transport des Urins von der Niere bis zur äußeren Öffnung des Harntraktes. Die Harnblase speichert im Regelfall bis zu 500 ml Urin (bei Blasenentleerungsstörung deutlich größere Volumina möglich) und kann mithilfe komplexer Muskelstrukturen und neuronaler Regelkreise kontrolliert Urin abgeben. Um sich diesen ständigen Volumenänderungen adäquat anpassen zu können, ist die Harnblase mit einem mehrschichtigen Übergangsepithel, dem so genannten Urothel, ausgekleidet. Abhängig vom Füllungszustand der Harnblase kommt es zu einer Veränderung der Zellform sowie der Anzahl der Zelllagen im Epithel. Des Weiteren hat das Urothel auch eine Barriere-Funktion, so dass ein Stoffaustausch zwischen Urin und interstitieller Flüssigkeit verhindert wird (Aumüller et al., 2010).

In etwa 94% der Fälle ist bei der Diagnose eines Harnblasenkarzinoms histologisch der Subtyp des Urothelkarzinoms (UC) nachweisbar. Nur sehr selten sind andere Subtypen wie das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom festzustellen (Kraywinkel et al., 2018). Eine Ausnahme stellt in den nordafrikanischen Ländern die erhöhte Inzidenz des Bilharziose-assoziierten Plattenepithelkarzinoms der Harnblase dar (Hautmann and Huland, 2006). Weltweit liegt das Harnblasenkarzinom auf Platz 10 der häufigsten Tumoren. Im Jahre 2020 erkrankten weltweit 573.278 Menschen neu an einem Harnblasenkarzinom. Dabei sind rund drei Viertel der betroffenen Personen Männer (Sung et al., 2021). Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter, so dass das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Männern bei 74 Jahren, bei Frauen bei 77 Jahren liegt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021a). Bei etwa einem Viertel der Patienten wird ein muskel-invasiv wachsendes Blasenkarzinom diagnostiziert (Sanli, et al., 2017). Während Männer insgesamt deutlich häufiger betroffen sind als Frauen, so ist bei den Frauen der Anteil muskelinvasiver Karzinome mit 32% deutlich höher als bei den Männern mit 24% (Kraywinkel et al., 2018).

Haupttrisikofaktor ist neben der Alters- und der Geschlechtskomponente der Nikotinabusus. Aber auch berufliche Expositionen mit Toxinen, wie aromatischen Aminen oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, können die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms begünstigen. Darüber hinaus stellt auch die Einnahme bestimmter Medikamente wie Cyclophosphamid (Zytostatikum) oder Pioglitazon (Antidiabetikum) einen Risikofaktor dar (Robert Koch-Institut, 2021). Unabhängig von diesen externen Faktoren

haben Studien zeigen können, dass es offenbar auch eine familiär bedingte Neigung für das Urothelkarzinom gibt (Martin, et al., 2017).

Das Leitsymptom des Harnblasenkarzinom ist die schmerzlose Makrohämaturie, welche bei 68% bis 97,5% der betroffenen Patienten auftritt. Aber auch irritative Symptome wie häufiger Harndrang mit nur geringen Entleerungsmengen (Pollakisurie) oder eine erschwerte, auch teilweise schmerzhafte Harnentleerung (Dysurie) sind bereits im Frühstadium der Erkrankung anzutreffen. Rezidivierende Infekte der Harnblase stellen ebenfalls ein Frühsymptom dar und sollte vor allem bei Männern an ein Harnblasenkarzinom denken lassen. Schreitet die Erkrankung weiter fort so kommt es bei vielen Patienten zu unspezifischen Flankenschmerzen und Knochenschmerzen bei ossären Tumormetastasen, sowie zur Tumor-typischen B-Symptomatik mit hohem Fieber, ungewolltem Gewichtsverlust und nächtlichem Schwitzen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020).

Diagnostisch steht bei einem klinischen Verdacht zunächst die Sonographie im Vordergrund. Goldstandard in der Primärdiagnostik stellt aber die Urethrozystoskopie dar, bei der eine Biopsie mit anschließender histologischer Klassifikation erfolgen sollte (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020).

1.2 Aktuelle Therapieoptionen des Urothelkarzinoms

Die von der *Union for International Cancer Control* (UICC) festgelegte klinische Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms beruht auf der histopathologischen TNM-Klassifikation. In diese Klassifikation fließen die Tumordinfiltration (T), der Befall von Lymphknoten (N = engl. *nodes*) und die Metastasierung (M) ein. Auf diese Weise wird zwischen nicht-invasiven papillären Tumoren (Ta), dem nicht-invasiven Carcinoma *in situ* (Tis) und invasiv wachsenden Tumoren (T1 - T4) mit oder ohne Lymphknotenbefall (N1 - N3 je nach Größe) und/oder Fernmetastasen (M1) unterschieden. Ein Stadium \geq T2 beschreibt ein muskelinvasives Tumorwachstum. Darüber hinaus erfolgt bei den invasiv wachsenden Tumoren das so genannte *Grading* des Tumors. Diese dreistufige Unterteilung (G1 - G3) gibt Informationen über den histologischen Differenzierungsgrad des Gewebes, so dass Rückschlüsse auf die Malignität des Tumors und somit die Prognose für den Patienten gezogen werden können (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). In 25% der Fälle liegt bei Erstdiagnose bereits ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom vor (Wit et al., 2020).

Ausgehend von der Stadieneinteilung, sowie des *Gradings* des Tumors werden die in der jeweils aktuellen Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft dargestellten therapeutischen Maßnahmen empfohlen. Bei nicht-muskelinvasiv wachsenden Tumoren wird laut aktueller Leitlinie (2020) die organerhaltende transurethrale Resektion (TUR) empfohlen. Je nach Risikoprofil kann im Anschluss eine intravesikale Instillationstherapie notwendig werden.

Patienten, bei denen bereits ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom vorliegt, erhalten eine multimodale Therapie. Besteht kein klinischer Hinweis einer Metastasierung stellt die radikale Zystektomie mit Harnableitung und bilateraler pelviner Lymphadenektomie die aktuell empfohlene Standardtherapie mit kurativer Intention dar. Eine alternative Option stellt bei diesen Patienten die trimodale Therapie (TUR und Radiochemotherapie) dar (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Dennoch bleibt die Prognose beim muskelinvasiv wachsenden Harnblasenkarzinom bis heute schlecht, da ungefähr die Hälfte aller Patienten innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung Fernmetastasen entwickelt (Yin et al., 2016). Durch eine zusätzliche neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie kann die Prognose des lokalisierten muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms verbessert werden. Zahlreiche klinische Studien haben einen signifikanten Überlebensvorteil bei Patienten mit zusätzlicher chemotherapeutischer Behandlung im Gegensatz zur Zystektomie allein zeigen können (Yin et al., 2016). So kann die Kombination aus Operation und perioperativer Cisplatin-basierter Chemotherapie das Gesamtüberleben nach zehn Jahren um 5-10% verbessern (Mahlknecht et al., 2014). Zusätzlich werden seit kurzem Immuncheckpoint-Inhibitoren in der multimodalen, perioperativen Systemtherapie des muskelinvasiven UCs eingesetzt (Bajorin et al., 2021, Apolo et al., 2024). Sowohl perioperativ beim fortgeschrittenen UC als auch palliativ im Falle einer bereits vorliegenden Metastasierung besteht die Standard-Erstlinientherapie aus einer Cisplatin-basierten Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin (GC-Schema) oder alternativ der Viererkombination aus Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin (MVAC-Schema). Durch dieses Therapieregime kann ein medianes Gesamtüberleben von 12-16 Monaten erzielt werden. Bereits nach 7 bis 9 Monaten kommt es im Anschluss an die erstmalige Therapie mit der Cisplatin-basierten Chemotherapie im Regelfall zu einem Krankheitsprogress, so dass weitere therapeutische Maßnahmen notwendig sind. Lediglich bei weniger als 20% kommt es zu einer dauerhaften Krankheitsremission (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Bei Patienten, die für eine Cisplatin-basierte Therapie nicht geeignet sind, werden alternativ Carboplatin-basierte Kombinationen eingesetzt. Diese sind in aller Regel jedoch weniger wirksam als die zuvor genannten Therapien. Ganz aktuell zeichnet sich ein Paradigmenwechsel in der Erstlinientherapie des metastasierten UCs ab. Vor kurzem wurden vielversprechende Ergebnisse für eine Kombinationstherapie mit Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (*antibody-drug-conjugates* = ADCs) und Immuncheckpointinhibitoren (ICIs) veröffentlicht. In einer Phase-III-Studie mit therapienaiven metastasierten und/oder inoperablen UC-Patienten führte die Kombinationstherapie mit dem ADC Enfortumab-Vedotin (EV) und dem ICI Pembrolizumab zu einer signifikanten und erheblichen Verbesserung sowohl der Ansprechrate, des progressionsfreien Überlebens (*Hazard Ratio* 0,45) als auch des Gesamtüberlebens

(*Hazard Ratio* 0,47) im Vergleich zu einer platinbasierten Standardchemotherapie (Powles et al., 2024). Platin-basierte Kombinationstherapien werden zukünftig dennoch einen hohen Stellenwert haben. Zum einen ist die Behandlung mit Enfortumab-Vedotin und Pembrolizumab ungleich teurer, zum anderen ist zum aktuellen Zeitpunkt nach einer solchen neuen Erstlinientherapie der Einsatz Platin-basierter Kombinationen weiterhin der Standard.

Auch wenn die Behandlung mit Cisplatin-basierten Therapiekonzepten bei der Behandlung des UCs in der Regel zunächst erfolgreich ist, so entwickeln fast alle Patienten im Verlauf ihrer Behandlung eine Resistenz gegen das Chemotherapeutikum Cisplatin (Niegisch et al., 2018). Darüber hinaus hat der stark zytotoxische Effekt von Cisplatin viele Nebenwirkungen zur Folge. Vor allem die starke Nephrotoxizität bedingt bei vielen Patienten eine Limitierung der Therapie oder führt bei einer bereits vorliegenden eingeschränkten Nierenfunktion der Patienten zum Ausschluss der therapeutischen Option (Cvitkovic et al., 1977). Dennoch ist die Resistenzentwicklung gegen das Chemotherapeutikum in den meisten Fällen der Hauptfaktor, der zu einer Limitierung der Behandlung führt, wodurch es zu einem unaufhaltsamen Tumorprogress kommt (von der Maase et al., 2005). Aus diesem Grund sind neue therapeutische Optionen für Patienten mit Cisplatin-resistenten UCs dringend erforderlich und wurden im Zuge dieser Arbeit untersucht.

1.3 Wirkungsweise von Cisplatin und Mechanismen der Resistenzentwicklung

Bei Cisplatin, genauer cis-Diammindichlorplatin(II), handelt es sich um eine anorganische Schwermetallkomplexverbindung, welche ein Platinatom im Zentrum enthält. Dieser Komplex bindet an die DNA-Basen innerhalb der menschlichen Körperzellen, wodurch es zu Vernetzungen innerhalb der DNA-Stränge und zwischen benachbarten DNA-Strängen kommt. Dies führt zur Hemmung der DNA-Replikation und -Transkription. Darüber hinaus führt Cisplatin auch zur Hemmung der DNA-Reparaturmechanismen, so dass ein Zellzyklusarrest und der programmierte Zelltod (Apoptose) herbeigeführt werden (Sorenson et al., 1990, Eastman, 1999).

Bereits seit der Zulassung von Cisplatin in den 70er Jahren hat sich das Chemotherapeutikum in der Praxis bei einer Vielzahl von Tumoren als sehr effektives therapeutisches Mittel gezeigt, darunter Ovarial- und Cervixkarzinome, Hoden-, Blasen- und Lungentumore sowie Neoplasien des Kopf- und Halsbereiches (Rocha et al., 2018, Galluzzi et al., 2012). Die Resistenzentwicklung gegen Cisplatin stellt bei der Tumorbehandlung allerdings ein weitreichendes Problem dar und limitiert die Heilungschancen der Patienten. Zahlreiche Studien haben sich in der Vergangenheit mit der Erforschung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Cisplatin beschäftigt und konnten eine Vielzahl zellulärer Veränderungen innerhalb der Zelle identifizieren, die dazu

führen, dass immer höhere Dosierungen des Chemotherapeutikums benötigt werden, um den Zelltod herbeizuführen (Walker et al., 1990, Galluzzi et al., 2012). Zum einen konnte beobachtet werden, dass resistente Zellen Mechanismen entwickeln, die zu einer reduzierten Verfügbarkeit von Cisplatin innerhalb der Zelle führen, z.B. durch Stilllegung von Transportern, die die Stoffe in die Zelle bringen oder eine erhöhte Aktivität des zellulären Effluxes, also dem Abtransport von Stoffen aus der Zelle heraus (Ishida et al., 2002, Samimi et al., 2004). Darüber hinaus spielt auch die Deaktivierung von Cisplatin durch Glutathion und Metallothionein innerhalb der Zelle eine bedeutende Rolle bei der Resistenzentwicklung (Bahnsen et al., 1991, Skowron et al., 2017). Schließlich konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass auch Veränderungen in der DNA-Reparaturmaschinerie und der Regulation der Apoptose sowie des Zellzyklus entscheidende Faktoren bei der Entstehung einer Cisplatin-Resistenz darstellen (Curtin, 2012, Drayton and Catto, 2012, Galluzzi et al., 2012, Henkels and Turchi, 1999). Basierend auf diesen Untersuchungen hat es sich etabliert die Cisplatin-Resistenzmechanismen einzuteilen in *pre-*, *on-* und *post-target* Faktoren. Dabei versteht man unter *pre-targets* beispielsweise die Ausschaltung von Transportern, unter *on-targets* die Interaktion von Cisplatin mit der DNA, sowie die Veränderungen der DNA-Reparatur und unter *post-targets* den Einfluss von Cisplatin auf die Apoptose und den Zellzyklus (Galluzzi et al., 2012).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte die multifaktorielle Genese der Cisplatin-Resistenz auch in UC-Zellen (UCCs) gezeigt werden. Dazu wurden Cisplatin-resistente UCCs, so genannte *Long Term Treated Cells* (=LTTs) entwickelt und im Hinblick auf ihre molekularen Anpassungsmechanismen durch die kontinuierliche Behandlung mit ansteigenden Cisplatin-Dosierungen charakterisiert (Skowron et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass die LTT-Zelllinien zum einen weniger Schaden nahmen durch die Behandlung mit Cisplatin und sich außerdem auch schneller von dem zugefügten Schaden erholen konnten. Eine mögliche Erklärung für diesen resistenteren Umgang mit Cisplatin war eine nachgewiesene Überexpression der Cisplatin-Exporter *ATP7A* und *ATP7B*, sowie des *MRP2*-Exporters, der für den Abtransport von Cisplatin-Glutathion-Konjugaten verantwortlich ist. Außerdem konnte auch eine Überexpression der Metallothioneine nachgewiesen werden, die für eine verbesserte Deaktivierung von Cisplatin innerhalb der Zelle sorgen könnten. Als Resultat konnte durch Skowron et al. (2018) eine Reduktion der DNA-Cisplatin Addukte und des DNA-Schadens gezeigt werden. Besonders auffällig war, dass in den Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien eine deutlich niedrigere Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSBs) nachgewiesen werden konnte, obwohl diese mit deutlich höheren Cisplatin-Dosierungen behandelt worden waren. Darüber hinaus konnte sogar eine Reduktion der DSBs nach 72 Stunden in den LTTs nachgewiesen werden, was für

eine Verbesserung der zelleigenen DNA-Reparaturwege spricht. Aus diesem Grund untersuchte die Arbeitsgruppe relevante Gene der DNA-Reparaturmaschinerie, darunter *MLH1*, *MSH2*, *POLH*, *ERCC1* und *ERCC2*, und konnte signifikante Veränderungen in der Genexpression feststellen, die insgesamt zu einer deutlichen Verbesserung der DNA-Reparaturmaschinerie führen könnten. Darüber hinaus waren die LTTs auch in der Lage die Apoptose zu umgehen, indem die Expression von anti-apoptotischen Faktoren, wie *BCL-xL* und *BIRC5*/Survivin induziert wurde (Skowron et al., 2018). All diese Erkenntnisse machen deutlich, dass die molekularen Mechanismen, die zur Cisplatin-Resistenz innerhalb der UCCs führen, multifaktoriell sind. Um die Resistenz zu umgehen sind daher therapeutische Ansätze notwendig, die nicht nur monokausal an einer Stelle ansetzen. Vielmehr scheint die Anwendung von Kombinationstherapien notwendig, um die zellulären Resistenzmechanismen zu umgehen oder auszuschalten und die Therapie für Menschen mit Cisplatin-resistentem UC wieder effektiver zu machen.

1.4 Pharmakologische Inhibitoren epigenetischer Enzyme (Epidrugs) als neue Therapieoption nach erfolgter Cisplatin-Behandlung

Im Fokus zahlreicher aktueller Forschungsprojekte zur Entstehung und Progression des UCs steht die Epigenetik (Niegisch et al., 2015). Darunter versteht man Prozesse innerhalb des Zellkernes, die mit Hilfe von Enzymen, Proteinen und RNA-Bestandteilen für die Regulation der Chromatinkonformation relevant sind und schließlich auch die Transkriptionsaktivität kontrollieren. Dazu gehören unter anderem DNA-Methylierungen, sowie Histonmodifikationen und Chromatinremodellierungen (Schulz, 2014). Studien konnten beweisen, dass Mutationen epigenetischer Regulatoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Harnblasenkarzinoms spielen. Es konnte sogar gezeigt werden, dass diese Mutationen in Karzinomzellen der Harnblase weitaus häufiger zu finden sind als in anderen Tumorentitäten (Gui et al., 2011, Robertson et al., 2017). Pharmakologische Inhibitoren von epigenetischen Enzymen könnten daher einen großen Einfluss auf die Funktionalität, Aktivität und vor allem die Reparaturmechanismen der Zelle haben. Daher hat sich unsere Arbeitsgruppe auf die Entwicklung neuer Therapieoptionen auf Basis von epigenetischen Inhibitoren spezialisiert. In Vorarbeiten konnte dargestellt werden, dass pharmakologische Inhibitoren von epigenetischen Regulatoren bei der Anwendung auf UC-Zelllinien zum einen die erwarteten kanonischen epigenetischen Wirkungen zeigte aber darüber hinaus auch DNA-schädigend wirken können und zusätzlich relevante Effekte auf Faktoren der DNA-Reparatur haben können. Besonders vielversprechend zeigten sich dabei die sogenannten Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) und die Bromodomänen-Inhibitoren (BETi) (Hölscher et al., 2018, Kaletsch et al., 2018, Pinkerneil et al., 2016b, Pinkerneil et al., 2016a).

1.4.1 *Histondeacetylase-Inhibitoren*

Histondeacetylasen (HDACs) sind Enzyme, die gemeinsam mit den gegensätzlich arbeitenden Histonacetyltransferasen (HATs) daran beteiligt sind die Homöostase in der menschlichen Zelle aufrecht zu erhalten. Basierend auf der jeweiligen Sequenzhomologie zu ihren Hefe-Orthologen werden HDACs in die Klassen I, II, III und IV unterteilt, wobei die Klassen I, II und IV als die so genannten „klassischen“ HDACs beschrieben werden. Hierzu zählen insgesamt elf Isoenzyme (Tabelle 1). Die Enzyme der Klasse III unterscheiden sich von den anderen HDAC-Klassen durch ihre katalytischen Eigenschaften und werden als Sirtuine bezeichnet (Gregoretto et al., 2004, Witt et al., 2009).

Tabelle 1: HDAC-Klassen und ihre Isoenzyme. Dargestellt sind die vier „klassischen“ HDAC-Klassen mit ihren jeweilig zugeordneten Isoenzymen. Zusätzlich ist der Tabelle zu entnehmen, in welchem Bereich der Zelle die jeweiligen Isoenzyme hauptsächlich zu finden sind.

Klasse	Isoenzym	Vorkommen
I	HDAC1	Zellkern
	HDAC2	Zellkern
	HDAC3	Zellkern
	HDAC8	Zellkern/Zytoplasma
IIA	HDAC4	Zellkern/Zytoplasma
	HDAC5	Zellkern/Zytoplasma
	HDAC7	Zellkern/Zytoplasma
	HDAC9	Zellkern/Zytoplasma
IIB	HDAC6	Zytoplasma
	HDAC10	Zytoplasma
IV	HDAC11	Zellkern/Zytoplasma

Wie der Name Histondeacetylasen bereits suggeriert, ging man lange davon aus, dass HDACs lediglich direkt an Histonen wirken. Heute weiß man aber, dass viele HDACs zumindest teilweise auch im Zytoplasma zu finden sind, wie Tabelle 1 zu entnehmen ist. Während HDACs der Klasse I vor allem im Zellkern zu finden sind und an der Modifikation von Histonen beteiligt sind, so sind die Isoenzyme der anderen Klassen auch im Zytoplasma vorhanden. Vor allem HDAC6 der Klasse IIB ist als ein wichtiges zytoplasmatisches Enzym bekannt, welches an der Regulation der Zellmotilität und Adhäsion beteiligt ist (Gregoretto et al., 2004, Witt et al., 2009, Hubbert et al., 2002).

Am besten verstanden ist bisher vor allem die direkte Aktivität der HDACs an den Histonen. Man geht davon aus, dass acetylierte Histone zu einer gesteigerten Genaktivität führen, da es durch die Acetylierung zu einer schwächeren Bindung zwischen Histonen und DNA kommt. Umgekehrt führen HDACs entsprechend dazu, dass es zu einer Deacetylierung und folglich zu

einer stärkeren Bindung zwischen Histonen und DNA kommt. Transkriptionsfaktoren können die DNA somit schwerer erreichen bzw. an diese binden – die Genexpression ist vermindert (Abb. 1). Somit sind HDACs ein wichtiger Faktor bei der Regulation von zellinternen Prozessen wie der Proliferation oder der Differenzierung (Reichert et al., 2012, de Ruijter et al., 2003).

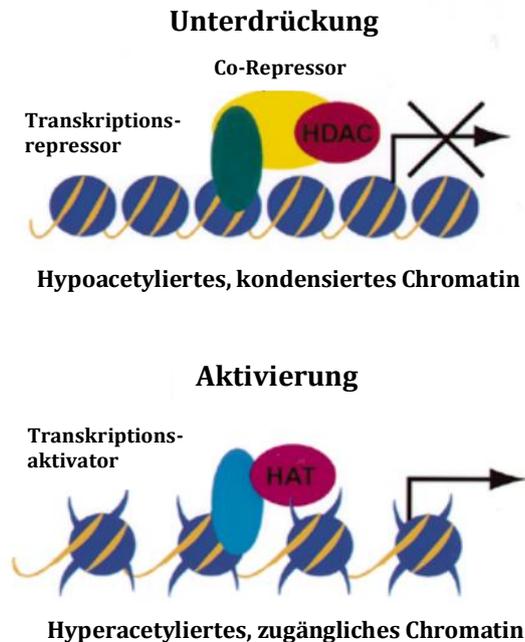


Abb. 1: Schematische Darstellung der Funktion von HDACs und HATs an Histonen. Dargestellt sind die Unterdrückung und die Aktivierung der Histone. Die blauen Kreise stellen die Histone dar, die orangefarbenen Linien stehen für die DNA. In Anwesenheit von HDACs kommt es zur Histon-Kondensation und somit Transkriptionsunterdrückung. In Anwesenheit von HATs wird die Transkription aktiviert. Unmodifiziert entnommen aus Wade (2001). Übersetzung und Vervielfältigung mit Genehmigung der Oxford University Press im Namen von Human Molecular Genetics. Haftungsausschluss für Übersetzungen: OUP und Human Molecular Genetics sind nicht verantwortlich oder in irgendeiner Weise haftbar für die Richtigkeit der Übersetzung.

Daten in der Literatur haben zeigen können, dass HDACs in zahlreichen menschlichen Tumorgeweben gegenüber den Normalgeweben überexprimiert sind, so dass die Anwendung von HDACi eine vielversprechende therapeutische Option bietet. Nakagawa et al. (2007) konnte nachweisen, dass in mehr als 75% der untersuchten menschlichen Tumorgeweben eine Überexpression von HDACs der Klasse I vorhanden ist. Dies gilt auch für UCs (Niegisch et al., 2013). Daher liegt der Fokus vieler Forschungsarbeiten vor allem auf den HDACs der Klasse I, also den Isoenzymen HDAC1,2,3 und 8. Man geht davon aus, dass diese die Proliferation der Tumorzellen vorantreiben, während sie die Differenzierung und Apoptose inhibieren (Witt et al., 2009). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben sich vor allem die HDACi 4SC-202, Givinostat und Romidepsin als vielversprechende Substanzen bei der

Behandlung von UCCs gezeigt. Alle drei Substanzen haben vor allem eine Wirkung auf HDACs der Klasse I. Es konnte belegt werden, dass durch die Anwendung dieser HDACi die Zellproliferation in Tumorzellen effektiv reduziert werden konnte, während es zusätzlich zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest und zur Induktion des Zelltodes kam (Pinkerneil et al., 2016b, Pinkerneil et al., 2016a). Allerdings haben die Untersuchungen auch gezeigt, dass die alleinige Anwendung der verwendeten HDACi auch einen supprimierenden Effekt auf die Proliferation von benignen Urothelzellen hatte, so dass in anschließenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Kombinationstherapien gearbeitet wurde. Ziel der Kombinationstherapien war, eine möglichst synergistische Wirkung zu erzielen, um dadurch eine Dosisreduktion zu ermöglichen und somit eine verminderte Toxizität gegenüber benignen Zellen zu erreichen. Als vielversprechender Kombinationspartner wurde zunächst der Bromodomäne-Inhibitor JQ1 untersucht.

1.4.2 Bromodomäne-Inhibitoren

Bei den sogenannten Bromodomänen (BET) handelt es sich um epigenetische Lesedomänen, die acetylierte Histone erkennen, an diese binden und durch Interaktion mit weiteren Proteinen einen relevanten Einfluss auf die Regulation der Transkription von Genen haben. Eines dieser BET-Proteine ist das so genannte BRD4-Protein. In Studien konnte die Aktivität des BRD4-Proteins als essenzieller Bestandteil in der Regulation der Gentranskription identifiziert werden (Di Micco et al., 2014, Wu et al., 2015). BRD4 ist in der Lage acetylierte Histone zu erkennen und an diese zu binden. Auf diese Weise fungiert BRD4 als eine Art Zentrum für den Zusammenbau großer Proteinkomplexe, die für die Gentranskription benötigt werden. Teil dieses Proteinkomplexes sind unter anderem der so genannte Mediator-Komplex, der für die Initiation der Transkription notwendig ist, sowie der positive Transkriptions-Elongationsfaktor P-TEFb. Durch die Bildung dieses Proteinkomplexes kommt es zur Rekrutierung der RNA-Polymerase der Zelle und somit zur Aktivierung der Gentranskription (Abb. 2) (Sanchez et al., 2014, Ferri et al., 2016, Donati et al., 2018).

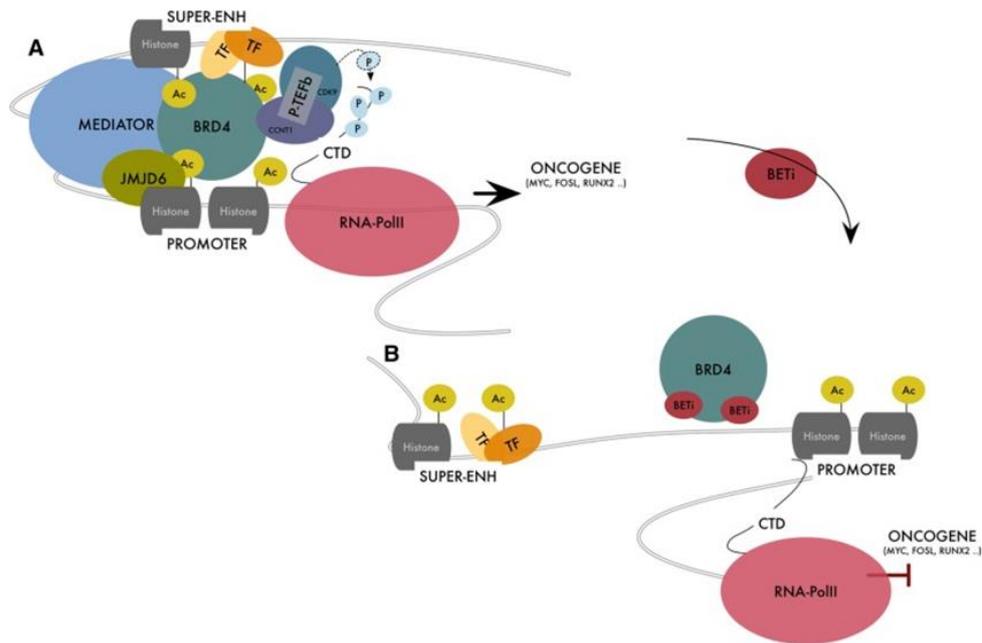


Abb. 2: A) Schematische Darstellung der Funktion des BET-Proteins BRD4 bei der Regulation der Transkription von Genen. BRD4 bindet an acetylierte Histone und bildet mit dem Mediator-Komplex und dem positiven Transkriptions-Elongationsfaktor P-TEFb einen großen Proteinkomplex zur Rekrutierung der RNA-Polymerase. Es kommt zur Aktivierung der Gentranskription. **B) Einfluss von BETi auf die Funktion des BRD4-Proteins.** BETi konkurrieren mit den acetylierten Histonen am BRD4-Protein und verhindern somit den Aufbau des Proteinkomplexes. Die Gentranskription wird verhindert. Open Access Creative Commons Attribution 4.0 International License: Unmodifiziert entnommen aus Donati et al. (2018), <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Wu et al. (2016) konnten nachweisen, dass BRD4 in UCCs signifikant erhöht war und dass das Protein einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation und die Apoptose von UCCs hat. Auch der Einsatz des BETi JQ1 auf UCCs wurde in dieser Studie erstmalig untersucht und als mögliche neue Substanz in der Therapie des UCs herausgearbeitet (Wu et al., 2016). Die Kombination aus einem HDACi und einem BETi hatte sich bereits in Studien zu anderen Tumorentitäten wie dem kutanen T-Zell Lymphom (Zhao et al., 2019), dem Melanom (Heinemann et al., 2015) oder dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (Mazur et al., 2015, Zhang et al., 2020) als vielversprechende therapeutische Option bewiesen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen untersuchte unsere Arbeitsgruppe den Effekt einer Kombinationstherapie mit dem HDACi Romidepsin und dem BETi JQ1 bei der Anwendung auf UCCs. Hölscher et al. (2018) konnten einen synergistischen Effekt der beiden Substanzen bei allen verwendeten UC-Zelllinien nachweisen. So konnte durch die Kombinationstherapie ein effizienter Zellzyklusarrest herbeigeführt, die Caspase-abhängige Apoptose induziert und die Zellklonogenität reduziert werden. Die gutartigen Kontrollzellen blieben von der Behandlung fast vollständig verschont und wurden lediglich in einen vorübergehenden Zellzyklusarrest

geschickt. Die Langzeitproliferationsfähigkeit wurde dabei nicht aufgehoben. Weiterführende Studien konnten allerdings nachweisen, dass die so genannten BETi der ersten Generation, wie beispielsweise JQ1 oder OTX015 ein sehr ungünstiges Nebenwirkungsprofil zeigten. Eine starke hämatologische und gastrointestinale Toxizität stellte beispielsweise in einer Phase 1 Studie bei Patienten mit Lymphom oder multiplem Myelom einen dosislimitierenden Faktor dar (Amorim et al., 2016).

1.4.3 Der BETi der neuen Generation: PLX51107

Ozer et al. (2018) beschrieben erstmalig die Anwendung eines BETi der neuen Generation mit dem Namen PLX51107 (PLX). Dieser wurde chemisch so verändert, dass er bei der durchgeführten Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil zeigte als sein Vorgänger JQ1 und andere BETi wie OTX015. Aufgrund der relativ geringen Halbwertszeit von PLX zeigte sich ein verbesserter therapeutischer Index (Verhältnis der letalen Dosis zur effektiven Dosis als Maß für die Sicherheit eines Pharmakons) im Gegensatz zu den vorherigen Generationen. Dies konnte auch im Mausmodell nachgewiesen werden. Außerdem konnte in weiteren Untersuchungen in der Zellkultur gezeigt werden, dass die kurzzeitige Anwendung von PLX zunächst zu Veränderungen der Transkription führten, nicht jedoch zur Induktion der Apoptose. Erst die Anwendung von PLX über mehrere Stunden zeigte eine apoptotische Wirkung auf die Zellen. Durch diese Beobachtungen konnte man also davon ausgehen, dass PLX gezielter eingesetzt werden kann, um gewünschte Effekte auf die Genexpression zu bewirken, ohne dass es zu einem ungerichteten Zelltod und somit zu unerwünschten Nebenwirkungen kommt.

Daher untersuchte unsere Arbeitsgruppe den Effekt von PLX auf UC-Zelllinien (Thy et al., 2021). In beiden verwendeten kommerziellen UC-Zelllinien (VM-CUB1 und UM-UC-3) konnte eine Überexpression des *BRD4*-Gens nachgewiesen werden. Als benigne Kontrollzelllinie wurden kommerzielle HBLAK-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine spontan immortalisierte Zelllinie, die aus benignen Uroepithelzellen hervorgegangen ist (Hoffmann et al., 2016). Thy et al. (2021) konnten nachweisen, dass die Zellproliferation beider UC-Zelllinien durch die Behandlung mit PLX gehemmt werden konnte. Die Kontrollzelllinie wiederum wurde durch die Behandlung lediglich in einen Status der Seneszenz versetzt. Darüber hinaus konnte durch die PLX-Behandlung auch eine Dysregulation der Zellzyklusgene dargestellt werden, wodurch es zu einer Akkumulation in der subG1-Phase kam. Bei der Zelltodanalyse konnte gezeigt werden, dass es bei den UC-Zelllinien zur Apoptoseinduktion kam, während dies bei benignen HBLAK-Zellen nur sehr schwach zu beobachten war. Bei beiden UC-Zelllinien kam es außerdem zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität von Caspase 3 und 7. Auch kam heraus, dass der Apoptoseregulator BCL2 durch die

Behandlung mit PLX herunterreguliert wurde. Dies erwies sich als besonders interessanter Fakt, da BCL2 mit der Apoptoseresistenz von UCCs assoziiert wird (Kunze et al., 2008).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit Arbeiten zur Wirkung von PLX auf andere Tumorentitäten, so kann man vergleichbare Resultate feststellen. Ozer et al. (2018) konnte in seiner Arbeit zur therapeutischen Wirkung von PLX auf CLL-Zellen ebenfalls nachweisen, dass es zu einer Hemmung der Proliferation der CLL-Zellen kam, während es bei gesunden T-Zellen zu keinem antiproliferativen Effekt kam. Die in dieser Studie durchgeführten PLX-Behandlungen maligner B-Zellen zeigten eine Inhibition des Zellwachstums, eine Akkumulation der malignen B-Zellen in der G0-G1-Phase, sowie eine gesteigerte Apoptose. Die Aktivierung des BRD4-Proteins wurde durch die Behandlung mit dem BETi reduziert, wodurch es zu einer verminderten Aktivierung der RNA-Polymerase II und folglich zu einer Verringerung der assoziierten Gene kam. In einem anschließenden CLL-Maus-Modell konnte Ozer et al. (2018) zusätzlich nachweisen, dass es durch die Behandlung mit PLX zu einer Reduktion der Tumorlast und folglich zu einer signifikant verlängerten Überlebensdauer kam. 2022 veröffentlichten Alcitepe et al. (2022) eine Studie zur Wirkung von PLX und dem HDACi Vorinostat auf Zellen der akuten myeloischen Leukämie (AML). Auch hier konnte gezeigt werden, dass PLX eine sehr vielversprechende Substanz für die Behandlung hämatologischer Malignomerkrankungen sein könnte, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Substanzen. Alcitepe et al. (2022) konnte nachweisen, dass es im Vergleich zu den Kontrollzelllinien bei der Behandlung der AML-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoseraten nach PLX-Behandlung kam. Außerdem wurde auch hier eine Akkumulation der Zellen in der G0-G1-Phase provoziert. Auch konnte bei den AML-Zellen eine Reduktion des Apoptoseregulators BCL2 durch PLX nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen der Arbeit durch Thy et al. (2021) deckt. Darüber hinaus konnte eine deutliche Reduktion der BRD4-Expression als Folge der PLX-Behandlung in den AML-Zellen gemessen werden (Alcitepe et al., 2022).

Zusammenfassend konnte also belegt werden, dass es durch die Behandlung von UCCs mit dem BETi PLX zum einen zu einer Hemmung der Proliferation und des Zellzyklus kommt und zum anderen Apoptose induziert wird. Dies deckt sich auch mit Studien zur Wirkung von PLX auf andere Tumorentitäten, vorrangig hämatologische Erkrankungen. Neben diesen Erkenntnissen beschäftigte sich Thy et al. (2021) außerdem mit der Frage, ob PLX auch zu DNA-Schäden führt und mit dem Einfluss von PLX auf die DNA-Schadensantwort.

Einer der verheerendsten Schäden für die DNA ist der DNA-DSB, wie er z.B. sekundär durch die Behandlung mit Cisplatin entstehen kann. Es kommt zu einem Bruch beider Stränge der DNA-Doppelhelix (Rocha et al., 2018). Thy et al. (2021) konnten nachweisen, dass es durch die Behandlung der UCCs mit PLX zu einer Anhäufung von DNA-DSBs kam. Die

Kontrollzelllinie HBLAK wiederum zeigte auch nach Behandlung mit PLX deutlich weniger DNA-DSBs im Vergleich zu den UCCs. Somit konnte nachgewiesen werden, dass durch die Behandlung mit dem BETi PLX nicht nur Apoptose induziert wurde, sondern auch Schaden an der DNA der Karzinomzellen verursacht wurde, während die benignen Urothelzellen weitestgehend verschont blieben. Soweit die Recherchen zum derzeitigen Zeitpunkt (April 2024) ergeben haben, ist dieser Aspekt bisher noch in keinen weiteren Studien untersucht worden.

Im Gegensatz dazu haben sich bereits mehrere Studien mit der Frage beschäftigt, welchen Einfluss BETi auf die DNA-Schadensantwort von Tumorzellen haben. Man geht davon aus, dass die Suppression einer funktionierenden DNA-Schadensantwort ein essentieller Bestandteil der krebsbekämpfenden Wirkung von BETi darstellt (Sarnik et al., 2021). Im Falle eines DNA-DSB stehen der Zelle zwei grundlegende Reparaturmechanismen zur Verfügung: die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ = *non-homologous end joining*) (Abb. 3). Man geht davon aus, dass der HR-Reparaturweg so gut wie fehlerfrei funktioniert, da er für die Anfertigung einer perfekten DNA-Kopie den homologen DNA-Strang als Matrize verwendet. Dem gegenüber steht der NHEJ-Reparaturweg, bei dem die beiden gebrochenen DNA-Enden lediglich miteinander verbunden werden. Dabei kommt es häufig zum Verlust einzelner Genfragmente und somit zu Fehlern in der DNA. Die Wahl des Reparaturweges hängt vor allem von der aktuellen Phase der Zelle innerhalb des Zellzyklus ab. Während der NHEJ-Weg vorrangig in der G₀/G₁-Phase Anwendung findet, so kann der HR-Weg nur innerhalb der S/G₂-Phase funktionieren. Grund dafür ist, dass nur in diesen Phasen ein homologer DNA-Strang für die HR-Reparatur zur Verfügung steht (Moynahan and Jasin, 2010, Peng and Lin, 2011, Rocha et al., 2018).

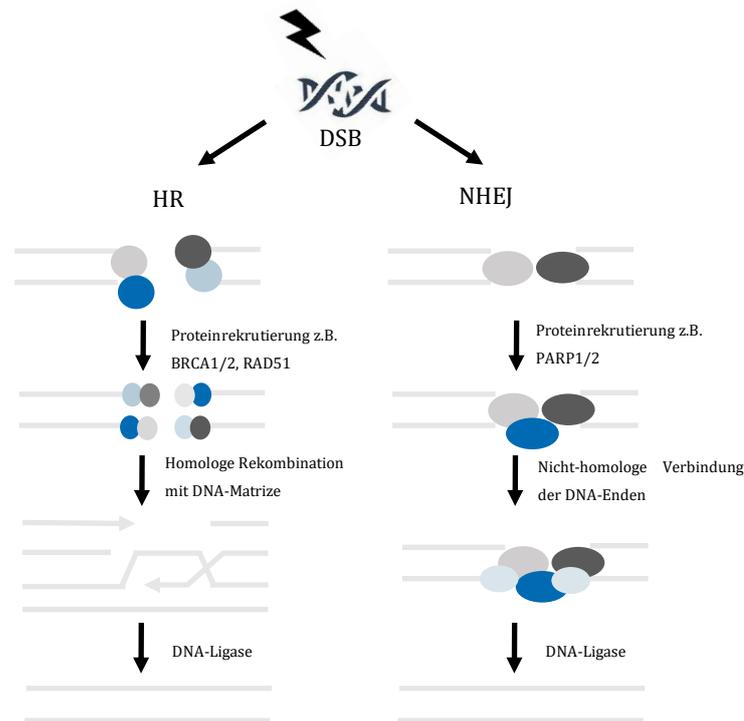


Abb. 3: Darstellung des HR- und des NHEJ-Reparaturweges nach DNA-DSB. Links Darstellung des HR-Wegs mit Verwendung eines homologen DNA-Strangs als Matrize. Rechts Darstellung des NHEJ-Wegs bei dem die gebrochenen DNA-Stränge ohne Matrize miteinander verbunden werden. Open Access Creative Commons Attribution 4.0 International License: Die Abbildung wurde selbst erstellt basierend auf Peng and Lin (2011), <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Sowohl für den HR- als auch für den NHEJ-Reparaturweg werden eine Vielzahl an Proteinen benötigt, die an den Ort des DNA-Strangbruchs rekrutiert werden, um dort die weiteren Prozesse der Reparatur voranzutreiben. Wichtige Vertreter dieser Proteine sind im HR-Weg BRCA1 und BRCA2, sowie RAD51 (Moynahan and Jasin, 2010). Im NHEJ-Weg spielen unter anderem PARP1 und PARP2 eine wichtige Rolle (Wang et al., 2006). Kommt es zu einem Defekt eines dieser Proteine oder der für die Herstellung der Proteine notwendigen Genabschnitte, so kommt es auch zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur. Im Falle eines Verlustes der relevanten Proteine oder Gene kann es sogar zu einem vollständigen Ausfall dieser wichtigen Reparaturprozesse kommen (Moynahan and Jasin, 2010). Vor allem eine Fehlfunktion des HR-Reparaturweges, z.B. bei einem Verlust des *BRCA1/BRCA2* Gens, ist daher direkt mit der Entstehung von Tumoren assoziiert (Peng and Lin, 2011). In einem solchen Fall ist die Zelle gezwungen auf die fehleranfällige NHEJ-Reparatur auszuweichen, wodurch DNA-Mutationen und somit die Entstehung maligner Tumore gefördert wird (Lord and Ashworth, 2016).

Basierend auf dieser theoretischen Grundlage wurde durch Thy et al. (2021) im nächsten Schritt die Expressionsveränderung relevanter Gene untersucht, die einen Einfluss auf die

Funktionsweise des HR- und des NHEJ-Reparaturweges haben. Die Untersuchungen zeigten, dass wichtige Schlüsselgene des HR-Reparaturweges durch die Behandlung mit PLX in den untersuchten UCCs herunterreguliert wurden, während relevante Gene des NHEJ-Weges verstärkt detektiert werden konnten. Konkret konnte dargestellt werden, dass die Gene *BRCA1*, *RAD51* und *FANCD2* des HR-Weges vermindert und die Gene *RAD17*, *RAD50* und *NHEJ* des NHEJ-Weges vermehrt nachweisbar waren. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits bei der Untersuchung anderer BETi gezeigt werden. Yang et al. (2017) verwendeten die BETi JQ1, I-BET762 und OTX015 auf Zellen des triple-negativen Mammakarzinoms (TNBC) und konnten ebenfalls eine Reduktion der Transkription der Gene *BRCA1* und *RAD51* und somit eine verringerte HR-Aktivität durch die Anwendung von BETi feststellen. Mio et al. (2019) untersuchten den Effekt von BETi auf das TNBC und verwendeten die Substanzen JQ1 und GSK525762. Auch hier konnte eine dosisabhängige Verminderung der *BRCA1* und *RAD51* Genexpression nachgewiesen werden. In Untersuchungen mit Zellen des Ovarialkarzinoms konnte bei der Anwendung von JQ1 eine Verminderung der *RAD51*- und *BRCA1*-Protein-Level detektiert werden (Sun et al., 2018)

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass PLX neben der Proliferationshemmung, der Apoptoseinduktion und dem Zellzyklusarrest auch zu DNA-Schäden führt und dass es zusätzlich zu einer Beeinträchtigung der DNA-Schadensantwort der Karzinomzellen kommt. Besonders interessant war, dass es durch den Einfluss von PLX zu einem relevanten Effekt auf die DNA-Reparaturmaschinerie kam. Durch den Verlust der für die HR-Reparatur relevanten Gene und die Induktion der Gene des NHEJ-Reparaturweges konnte davon ausgegangen werden, dass der BETi eine künstliche HR-Defizienz erzeugt und es somit zu einer Verschiebung zugunsten des fehleranfälligen NHEJ-Reparaturweges kam. In der Literatur wird dieser Zustand als *BRCAness* beschrieben, da vor allem der Verlust des *BRCA*-Gens den Zustand der HR-Defizienz begünstigt (Lord and Ashworth, 2016).

1.5 Das Konzept der *BRCAness* und ihre therapeutischen Möglichkeiten

Laut Lord and Ashworth (2016) spricht man von einem Zustand der *BRCAness*, wenn in den Zellen eines Tumors eine HR-Defizienz nachgewiesen werden kann. Diese muss nicht zwangsläufig durch die Abwesenheit der Gene *BRCA1* oder *BRCA2* bedingt sein, da auch andere für die HR-Reparatur relevante Gene der Auslöser für eine insuffiziente HR-Reparatur sein können. Beispiele dafür sind *RAD51*, die Gene der Fanconi-Anämie Gruppe (*FANC*), sowie die Gene *CDK12* und *ERCC1*. In den vergangenen Jahren haben sich zahlreiche Studien bei der Erforschung neuer therapeutischer Möglichkeiten mit dem Konzept der *BRCAness* befasst und sich diese zunutze gemacht. Die Idee: HR-defiziente Tumore sind auf die fehleranfällige NHEJ-Reparatur angewiesen. Pharmakologische Substanzen, die den NHEJ-Reparaturweg

blockieren, können dazu beitragen, dass der Zelle alle Möglichkeiten der Reparatur von DNA-DSBs genommen werden und die Zelle somit in den programmierten Zelltod gezwungen wird. Ein weiteres Wachstum und weitere durch die NHEJ-Reparatur geförderte Mutationen des Tumors werden somit unterbunden (Lord and Ashworth, 2012). Dieses Konzept hat sich bei der Behandlung von Tumoren mit einer bestehenden HR-Defizienz bereits als sehr effektiv erwiesen. Darunter fallen vor allem das BRCA-mutierte Mammakarzinom und das BRCA-mutierte Ovarialkarzinom. Als besonders vielversprechende Substanzen haben sich dabei die so genannten PARP-Inhibitoren (PARPi) gezeigt.

1.5.1 Anwendung von PARPi bei BRCA-mutierten Tumoren

Die Familie der PARP-Proteine besteht aus einer Reihe von Enzymen, die an diversen DNA-Reparaturmechanismen der Zelle beteiligt sind. Wang et al. (2006) konnte nachweisen, dass vor allem das Protein PARP1 eine entscheidende Rolle bei der NHEJ-Reparatur spielt. PARP1 ist ein Schlüsselenzym, welches im Falle eines DNA-Defektes diesen auf dem DNA-Strang erkennt und weitere Reparaturfaktoren rekrutiert. Dabei spielt PARP1 vor allem bei der Reparatur von DNA-DSBs im Zuge der NHEJ-Reparatur, sowie bei der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (*single-strand breaks* = SSBs) eine entscheidende Rolle (Eustermann et al., 2015, Audebert et al., 2004, Rose et al., 2020). Aus diesem Grund bestand lange die Annahme, dass PARPi dazu führen, dass das PARP1-Enzym blockiert wird, die SSBs dadurch nicht mehr repariert werden können und es folglich zu DSBs kommt, die bei einer vorliegenden HR-Defizienz nicht repariert werden können (Bryant et al., 2005). Aktuelle Studien aber haben zeigen können, dass die Wirkungsweise von PARPi darauf beruht, dass diese das PARP1-Enzym auf der DNA „festhalten“, indem sie mit dem PARP-Enzym Co-factor β -NAD⁺ interagieren (Lord and Ashworth, 2017). Durch das PARPi-bedingte „Festhalten“ (*Trapping*) von PARP1 wird die Funktion des Enzyms außer Kraft gesetzt, was eine Reparatur auf dem NHEJ-Weg verhindert. Außerdem entsteht durch die Fixierung des PARP1-Enzyms eine für das Replisom unüberwindbare Blockade. Es kommt zum Zusammenbruch der Replikationsgabel und folglich zu der Entstehung von DSBs (Rose et al., 2020). Infolgedessen wird die Zelle also in Anwesenheit eines PARPi abhängig von anderen Reparaturwegen, vorzugsweise der HR-Reparatur (Murai et al., 2012, Antolin et al., 2020).

Legt man diese Wirkungsweise von PARPi zugrunde, so wird auch verständlich, wieso PARPi als Monotherapie bisher nur bei HR-defizienten Tumorzellen einen Effekt zeigen konnten. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung des chemotherapieresistenten BRCA-mutierten Ovarialkarzinoms mit PARPi zu vielversprechenden Resultaten führte. Es zeigte sich eine hohe Antitumoraktivität und eine niedrige Nebentoxizität (Audeh et al., 2010, Evers et al., 2010). 2014 wurde Olaparib unter dem Handelsnamen Lynparza als erster PARPi für die Behandlung des fortgeschrittenen

Ovarialkarzinoms bei vorliegender *BRCA1/BRCA2* Mutation durch die European Medicines Agency (EMA) zugelassen (European Medicines Agency, 2024a). In einer Phase II Studie konnten Kaufman et al. (2015) nachweisen, dass Olaparib auch bei anderen Tumorentitäten, die ebenfalls eine *BRCA1/BRCA2* Mutation aufweisen, einen positiven Effekt auf den Tumorprogress zeigt. Darunter waren Patienten mit BRCA-mutiertem Ovarial- und Mammakarzinom, aber auch Pankreas- und Prostatakarzinompatienten. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass der Effekt von PARPi im direkten Zusammenhang mit der HR-Defizienz der Zelle steht und dass Patienten mit einer vorliegenden HR-Defizienz unabhängig von der Tumorentität vom Einsatz von PARPi profitieren könnten. Heute (Stand April 2024) ist Olaparib bereits für die Behandlung weiterer Tumore zugelassen, wie das BRCA-mutierte HER2-negative Mammakarzinom, das BRCA-mutierte Pankreaskarzinom sowie das BRCA-mutierte metastasierte kastrationsresistente (kein Ansprechen auf eine Hormonenzugstherapie) Prostatakarzinom (mCRPC) (European Medicines Agency, 2024a).

Das zugrunde liegende Konzept, welches sich in der Zulassung von Olaparib widerspiegelt, wird in der Literatur als *synthetic lethality* bezeichnet und beschreibt, dass einzelne Mutationen nicht zum Tod der Zelle führen. Die Kombination aus zwei nicht-tödlichen Mutationen wiederum führt den Zelltod herbei (Lord et al., 2015). Olaparib ist als Monotherapeutikum bisher lediglich zugelassen, wenn bereits eine BRCA-Mutation vorliegt. Somit kommt es also zu einer *synthetic lethality* durch die vorliegende BRCA-Mutation und der durch Olaparib herbeigeführten PARP-Inhibition (European Medicines Agency, 2024a). Gleiches gilt auch für den PARPi Talazoparib, der 2019 erstmalig in der Europäischen Union (EU) zugelassen wurde. Auch hier besteht die EU-Zulassung in der Monotherapie lediglich beim BRCA-mutierten Mammakarzinom (European Medicines Agency, 2024b). Darüber hinaus ist Olaparib auch bereits als Kombinationspartner mit anderen Substanzen klinisch zugelassen, beispielsweise bei der Behandlung des mCRPC. In Kombination mit dem Antihormon Abirateron, welches zu einer Insuffizienz der HR-Reparatur führt, hat Olaparib sowohl bei Patienten mit, als auch ohne *BRCA1/2*-Mutation eine EU-Zulassung (European Medicines Agency, 2024a). Auch besteht eine Zulassung für die Kombination aus Talazoparib und Enzalutamid (nichtsteroidales Antiandrogen) für die Behandlung des mCRPC (European Medicines Agency, 2024b).

1.5.2 Anwendung von Kombinationstherapien zur Erzeugung einer künstlichen *BRCAness* bei funktionierender HR-Reparatur

Im Gegensatz zu den zuvor aufgezeigten Tumorentitäten weisen UCCs nur in den wenigsten Fällen eine genetisch manifestierte *BRCAness* und somit eine genetisch bedingte defiziente HR-Reparatur auf (Robertson et al., 2017). Aus diesem Grund war bei der alleinigen Behandlung von UCCs mit einem PARPi in unseren Untersuchungen kein Effekt hinsichtlich

der Zellviabilität zu erwarten. Aktuelle Studien zur Behandlung des UCs lieferten aber bereits erste Anhaltspunkte dafür, dass PARPi als Kombinationspartner oder bei Patienten mit Hinweisen auf eine HR-Defizienz gute Resultate hervorbringen könnten. So konnte bei der sogenannten ATLANTIS-Studie gezeigt werden, dass die Anwendung des PARPi Rucaparib als Erhaltungstherapie nach bereits erfolgter Cisplatin-basierter Chemotherapie bei Patienten mit einer nachgewiesenen DNA-Reparaturdefizienz zu einem verlängerten progressionsfreien Überleben führte. Das Gesamtüberleben konnte aber nicht signifikant verlängert werden (Crabb et al., 2023). Bei der sogenannten BAYOU-Studie handelt es sich um eine randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Phase II Studie zur Ermittlung der Wirksamkeit einer Kombinationstherapie aus Durvalumab und Olaparib im Vergleich zu Durvalumab plus Placebo. Eingeschlossen wurden Patienten mit einem metastasierten UC, die sich nicht für eine Cisplatin-basierte Behandlung eigneten. In dieser Studie zeigte sich zunächst keine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens bei der Anwendung der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Behandlung mit Durvalumab allein. In einer sekundären Analyse der Daten konnte allerdings ermittelt werden, dass es bei den Patienten mit Hinweisen auf eine HR-Mutation bei der Anwendung der Kombinationstherapie zu einem längeren progressionsfreien Überleben kam im Vergleich zur Behandlung mit Durvalumab plus Placebo (Median 5,8 Monate gegenüber 1,8 Monaten) (Rosenberg et al., 2023). In beiden Studien waren die Fallzahlen sehr gering, dennoch konnte ein möglicher positiver Effekt bei der Anwendung von PARPi bei Patienten mit einer HR-Defizienz detektiert werden.

Das Konzept der *synthetic lethality* ist bei der PARPi-Monotherapie bei einer funktionierenden HR-Reparatur nicht gegeben. Daraus entstand die Idee einer Kombinationstherapie aus einem PARPi und einem BETi. Durch die Anwendung eines BETi wie PLX kann durch die Herunterregulierung der für die HR-Reparatur relevanten Gene, wie z.B. *BRCA1/BRCA2*, *RAD51*, *Fanconi-Gene* etc., eine künstliche HR-Defizienz hergestellt werden. Es kommt also zu einem Zustand, wie er bei BRCA-mutierten Karzinomen vorliegt und somit zu einer Sensibilisierung der UCCs gegenüber der Behandlung mit einem PARPi (Mio et al., 2019). Dieses Konzept wurde bereits in einigen präklinischen Studien untersucht, mit vielversprechenden Ergebnissen. Dabei wurden bisher vor allem das Mamma- und das Ovarialkarzinom mit funktionierender HR-Reparatur genauer untersucht, da die HR-defizienten Variante dieser Tumorentitäten bereits in der Klinik mit der PARPi-Monotherapie behandelt werden (Kaufman et al., 2015, European Medicines Agency, 2024a). Zellen des TNBC ohne *BRCA1/2*-Mutation, die in Untersuchungen nur mäßig auf eine Monotherapie mit PARPi angesprochen hatten, zeigten in einer Studie durch Yang et al. (2017) eine starke Reaktion auf die Behandlung mit einem PARPi (Olaparib und

Veliparib/ABT888) in Kombination mit allen drei verwendeten BETi (JQ1, IBET762 und OTX015). In dieser Studie wurde außerdem auch der Effekt der Kombinationstherapie des PARPi Olaparib und dem BETi JQ1 auf Zellen des Ovarial- und des Prostatakarzinoms untersucht. Auch hier konnte eine starke Synergie der beiden Substanzen gezeigt werden. Dieser synergistische Effekt von JQ1 und Olaparib konnte auch in einem Mausmodell bei der Behandlung des BRCA-Wildtyp Ovarialkarzinoms bewiesen werden (Karakashev et al., 2017). In einer Arbeit durch Fiorentino et al. (2020) konnte darüber hinaus auch ein synergistischer Effekt des BETi I-BET762 und des PARPi Talazoparib bei der Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms belegt werden.

Thy et al. (2021) untersuchten erstmalig die Synergie des BETi PLX und des PARPi Talazoparib bei der Behandlung von UCCs. Zu diesem Zweck verwendete die Arbeitsgruppe die UC-Zelllinie UM-UC-3, da diese sich besonders resistent gegenüber der Einzelbehandlung mit Talazoparib gezeigt hatte. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Talazoparib und PLX auch in sehr niedrigen Dosierungen zu einer effektiven Induktion des Zelltodes führte. Durch die Synergie der Kombinationstherapie konnte eine starke Reduktion der Einzeldosierungen herbeigeführt werden, so dass die Kontrollzelllinie HBLAK weitestgehend verschont blieb und entsprechend von einer tolerablen Nebentoxizität der Kombinationstherapie auszugehen ist.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen Kombinationstherapie, die bei Patienten mit fortgeschrittenem UC und einer bereits bestehenden Cisplatin-Resistenz erstmalig neue Therapieoptionen bieten könnte. Da die molekularen Mechanismen der Cisplatin-Resistenzentwicklung multifaktoriell sind, werden Kombinationstherapien benötigt, die in der Lage sind, diese Mechanismen erfolgreich zu umgehen. Einen globalen Ansatz stellen epigenetische Inhibitoren dar. Zudem war bekannt, dass Cisplatin-resistente Zellen dem Therapie-induzierten Stress vor allem durch Veränderungen in der DNA-Reparatur entgehen. Daher könnten Inhibitoren der DNA-Reparatur wie z.B. PARPi ebenfalls ein sinnvoller Ansatz sein. In der hier vorliegenden Arbeit habe ich mich also mit der Frage beschäftigt, ob Kombinationstherapien aus PARPi mit epigenetischen Inhibitoren, wie dem HDACi Romidepsin und dem BETi PLX51107, bei Cisplatin-resistenten UCCs eine Wirkung zeigen. Für die Analyse habe ich kommerzielle UC-Zelllinien verwendet, die bisher noch keinen Kontakt zu Cisplatin hatten, so genannte parentale Zellen und deren Cisplatin-resistente Sublinien (LTTs). Die Zelllinien (RT-112, T24, J82, 253J und LTT-Sublinien, sowie Kontrollzelllinien) wurden gleichermaßen mit den verschiedenen Substanzen und ihren Kombinationen behandelt und die Auswirkungen auf die Zellviabilität, die Apoptose, den Zellzyklus, sowie Veränderungen auf Protein und Gen-Ebene analysiert.

Darüber hinaus sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob durch die Kombination zweier Substanzen eine Dosisreduzierung herbeigeführt werden kann, um eine möglichst geringe Nebentoxizität zu erwirken. Ziel dieser Arbeit ist es also herauszufinden, ob durch die Kombinationstherapie die Cisplatin-Resistenzmechanismen umgangen werden können und somit zukünftig vielversprechende neue therapeutische Optionen für Patienten mit einer Cisplatin-Resistenz ermöglicht werden könnten.

2 Material

2.1 Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien. Gelistet sind die Namen der Zelllinien, sowie das Geschlecht (M = männlich, F = weiblich) und das Alter der Spender in Jahren. Zusätzlich sind die TNM-Klassifikation und/oder das *Grading* (G), sowie die Herkunft der Zellen dargestellt. Die Bezeichnung TCC steht für *transitional cell carcinoma* = Urothelkarzinom. Weitere Angaben zum T- und/oder G-Stadium sind hier nicht bekannt. Die UC-Zelllinien wurden von Prof. M.A. Knowles (ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds UK) und Dr. J. Fogh (Sloan-Kettering Cancer Research Center, Rye, New York USA) zur Verfügung gestellt und von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die HBLAK-Zelllinie wurde freundlicherweise von der Firma CellnTec zur Verfügung gestellt (Hoffmann et al., 2016). Alle Zelllinien sind kommerziell erhältlich. Alle LTT-Zelllinien haben die hier gelisteten Zelllinien als Ursprung und wurden von der Arbeitsgruppe für mehrere Monate mit aufsteigenden Cisplatin-Dosierungen behandelt (Skowron et al., 2018). Diese sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Zelllinie	Spendergeschlecht, Spenderalter (Jahre)	TNM/ <i>Grading</i>
253J	M, 53	T4, G4
HBLAK	M, 80	Kontrollzelllinie aus der Blase (Urothel)
J82	M, 58	TCC (keine weiteren Angaben)
RT-112	F, unbekannt	G2
T24	F, 81	G3
UM-UC-3	M, unbekannt	TCC (keine weiteren Angaben)
VM-CUB1	M, unbekannt	TCC (keine weiteren Angaben)

Tabelle 3: Erhaltungstherapie der LTT-Zelllinien. Die Behandlung mit den Zelllinien-spezifischen Cisplatin-Dosierungen erfolgte zwei Mal pro Woche.

Zelllinie	Konzentration Cisplatin zur Erhaltungstherapie
RT-112 LTT	15 µg/ml
T24 LTT	8,5 µg/ml
253J LTT	2,5 µg/ml
J82 LTT	2 µg/ml

2.2 Materialien für die Zellkultur

Tabelle 4: Materialien in der Zellkultur

Material	Hersteller
(D)PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich
Accutase-Lösung	Sigma-Aldrich
Automatischer Zellzähler TC20TM	BioRad
CnT-Prime Epithelzellkulturmedium	CELLnTEC
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) enthält GlutaMAX (stabilisiertes Glutamin)	GIBCO
Essigsäure (100%)	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck Millipore
Kollagen IV	Sigma-Aldrich
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %)	GIBCO
Zählkammer	BioRad
Zellkulturflaschen (T25) für fortgeschrittene Gewebekulturen (Advanced TC Flaschen)	Greiner bio-one
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-, 6-Well)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-Well) für fortgeschrittene Gewebekulturen (Advanced TC Multiwellplatten)	Greiner bio-one

Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien. Für die UCCs und die Kontrollzelllinie HBLAK wurden unterschiedliche Zellkulturmedien verwendet.

Zelllinie	Zusammensetzung Medium
RT-112, T24, 253J, J82	DMEM + GlutaMax + 10% hitzeinaktiviertes FCS
RT-112 LTT, T24 LTT, 253J LTT, J82 LTT	
HBLAK	CnT-Prime Epithelzellkulturmedium

Tabelle 6: Verwendete pharmakologische Substanzen. Aus der Tabelle geht der Wirkstoff und die Wirkstoffklasse, sowie das Lösungsmittel hervor, in dem die Substanz aufgelöst wurde. Für die Null-Konzentration bei der Behandlung der Proben wurde immer das entsprechende Lösungsmittel verwendet.

Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Lösungsmittel	Hersteller
Cisplatin	Zytostatikum	H ₂ O	Hexal
Olaparib	PARPi	DMSO	Selleckchem
PLX51107	BETi	DMSO	Selleckchem

Romidepsin	HDACi	DMSO	Selleckchem
Talazoparib	PARPi	DMSO	Selleckchem

2.3 MTT-Test

Tabelle 7: Material für den MTT-Test

Material	Hersteller
(D)PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
iMark™ Microplate reader	BioRad
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich
Zellkulturplatten (96-Well) für fortgeschrittene Gewebekulturen	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96-Well)	Greiner bio-one

2.4 Giemsa/Krystallviolett Färbung

Tabelle 8: Material für die Giemsa- bzw. Krystallviolett-Färbung

Material	Hersteller
(D)PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich
Giemsas Azur Eosin Methylenblaulösung	Merck Millipore
Krystallviolett (0,1% gelöst in DPBS)	Merck Millipore
Methanol 100%	Merck Millipore

2.5 RNA-Analyse

Tabelle 9: Material für die RNA-Isolierung

Material	Hersteller
β-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen
Qiagen RNeasy Shredder Kit	Qiagen
RNase free water	Qiagen
RNase-free DNase Set	Qiagen

Tabelle 10: Material für die reverse Transkription

Material	Hersteller
FastGene Scriptase II cDNA Kit	Nippon Genetics

Tabelle 11: Material für die qRT-PCR

Material	Hersteller
Ampuwa	Fresenius Kabi
LightCycler 480 Multiwellplatte 96	Roche
LightCycler 480 Sealing Foil	Roche
LightCycler 96	Roche
Luna universal qPCR Master Mix	New England BioLabs
PCR Tubes	Eppendorf
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	Qiagen

Tabelle 12: Zusammensetzung qPCR Master Mix. Die Verwendung des Reagenzes ist abhängig vom Primer und ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Mastermix	Volumen pro Well
Luna® universal qPCR Master Mix (2-fach konzentriert) bzw. QuantiTect SYBR Green® PCR Master Mix (2-fach konzentriert)	10,0 µl
Primer forward 100 pmol/µl (1:10 mit Ampuwa)	0,5 µl
Primer reverse 100 pmol/µl (1:10 mit Ampuwa)	0,5 µl
Ampuwa	7,0 µl
Mastermix gesamt	18,0 µl

Tabelle 13: Verwendete Primer. Gezeigt werden die Primer-Namen sowie ihre 5'-3' Sequenz für den *forward* (Fwd.) und den *reverse* (Rev.) Primer. Die Zweischnitt PCR wurde mit dem Luna® universal qPCR Master Mix vom New England BioLabs durchgeführt. Die Dreischnitt PCR wurde mit dem QuantiTect SYBR Green® PCR Master Mix von Qiagen durchgeführt. Die Temperatur zeigt die Anlagerungs-Temperatur der Primer an die DNA. Der Primer-spezifische Standard ist die Zelllinie, die für die Standardreihe bei der PCR eingesetzt wurde.

Primer		DNA Sequenz 5'-3'	Temperatur/ Reagenz	Standard	Hersteller
TBP	Fwd.	GAGCCAAGAGTGAAGAACAGTC	Zweischnitt 60°C Luna®	UM-UC-3	Sigma-Aldrich
	Rev.	GCTCCCCACCATATTCTGAATCT			
BRCA1	Fwd.	AAAGGGCCTTCACAGTGTCC	Zweischnitt 60°C Luna®	VM-CUB1	Sigma-Aldrich
	Rev.	CCTGTGTCAAGCTGAAAAGCA			
BRCA2	Fwd.	GGAGCTGAGGTGGATCCTGA	Zweischnitt 60°C Luna®	VM-CUB1	Sigma-Aldrich
	Rev.	CATGAGGAAATACAGTTTCAGATGCTT			
RAD51	Fwd.	CAACCCATTTACGGTTAGAGC	Zweischnitt	VM-CUB1	Sigma-Aldrich

	Rev.	TTCTTTGGCGCATAGGCAACA	60°C Luna®		
PARP1	Fwd.	TGCTGCTGTGAACTCCTCTG	Zweischritt	UM-UC-3	Sigma-Aldrich
	Rev.	CATGGCCTTCACTTCATCCT	60°C Luna®		
PARP2	Fwd.	ACACCCATTGGACCAACACT	Zweischritt	RT-112	Sigma-Aldrich
	Rev.	GTGGGAGCATGGGTAGATTG	60°C Luna®		
POLE2	Fwd.	TGAGAAGCAACCCTTGTCATC	Zweischritt	VM-CUB1	Sigma-Aldrich
	Rev.	TCATCAACAGACTGACTGCATTC	60°C Luna®		
POLD3	Fwd.	GCCATGCTAAAGGACAGTGG	Zweischritt	VM-CUB1	Sigma-Aldrich
	Rev.	CGAAGAGGATTCAGCAGGAG	60°C Luna®		
NHEJ1	Fwd.	AGTGCCAAGTGAGGGAGCTA	Zweischritt	RT-112	Sigma-Aldrich
	Rev.	TTTCTTCAAATGGTTCTGTCTTCA	60°C Luna®		
FANCD 2	Fwd.	GGCCAAGTGGGATAAAGAG	Zweischritt	RT-112	Sigma-Aldrich
	Rev.	TGATCAGTTCGGGACACCA	60°C Luna®		
RAD17	Fwd.	CTCGGTTGCCCTCTCATTTA	Zweischritt	RT-112	Sigma-Aldrich
	Rev.	CTCCAGGCATGTGTGACATTT	60°C Luna®		
BCL2	Fwd.	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	Dreischritt	VM-CUB1	Sigma-Aldrich
	Rev.	CAGAGGCCGCATGCTGGG	59°C SYBR®		
ERCC1	Fwd.	AGGAAGAAATTTGTGATAC	Dreischritt	VM-CUB1	Sigma-Aldrich
	Rev.	TGTGTAGATCGGAATAAG	55°C SYBR®		
ERCC2	Fwd.	GCGTCCCCTACGTCTACACA	Zweischritt	RT-112	Sigma-Aldrich
	Rev.	CATGGCATCGAAGGTAAGAAA	60°C Luna®	LTT	

2.6 Protein-Analyse

Tabelle 14: Material für die Protein-Isolierung

Material	Hersteller
(D)PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich
RIPA-Puffer (1-fach konzentriert)	Cell Signaling

Tabelle 15: Material für den BCA Protein Test

Material	Hersteller
BSA Standard (Albumin)	Thermo Fisher Scientific
iMark™ Microplate reader	BioRad
Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
RIPA-Puffer (1-fach konzentriert)	Cell Signaling
Zellkulturplatten (96-Well)	Greiner bio-one

Tabelle 16: Material für die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Material	Hersteller
RIPA-Puffer (1-fach konzentriert)	Cell Signaling
Roti®-Load1 (4-fach konzentriert)	Carl Roth

Tabelle 17: Material für die Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gels (Trenngel und Kammergel)

Material	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Mini-PROTEAN Spacer Plates + Gelkamm	BioRad
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Module	BioRad
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Rotiphorese®Gel 30 (37,5:1) (PAA 30%)	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Merck Millipore

Tabelle 18: Material für die SDS-PAGE

Material	Hersteller
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad
Sample Loading Guide (Probenführung)	BioRad
Tris / Glycin / SDS Puffer (SDS-Page Elektrophoresepuffer)	BioRad

Tabelle 19: Material für den Western Blot

Material	Hersteller
Immobilon®-P Membran, PVDF, 0,45 µm	Merck Millipore
Methanol 100%	Merck Millipore
10x SDS-Page Elektrophoresepuffer	BioRad
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BioRad
10x Tris / Glycin Puffer (Western Blotting Puffer)	BioRad
Whatman™ Gel Blot Paper	Whatman

Tabelle 20: Material für die Protein-Detektion. Die Primär- und Sekundärantikörper, die in Milchpulver verdünnt auf die Membran gegeben wurden, sind Tabelle 22 und Tabelle 23 zu entnehmen. Die gelisteten Materialien NaCl, Tris und HCl werden zusammengeführt zum TBS-Puffer, bzw. mit Tween zum TBS-T Puffer.

Material	Hersteller
ChemiDoc™ Imaging System	BioRad
Clarity™ Western ECL Substrate	BioRad
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Merck Millipore
Tween 20	Sigma-Aldrich

Tabelle 21: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE. Die Verdünnungen der Puffer wurden mit H₂O angefertigt. Dieses wurde mit der Q-Gard® 2 Anlage von Millipore aufbereitet.

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Page Elektrophoresepuffer	1x Tris/Glycin/SDS Puffer
TBS-Puffer (10x)	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris mit HCl auf pH 7,6 eingestellt
TBS-T-Puffer (1x)	1x TBS-Puffer, 0,1 % Tween
Western Blotting Puffer	1xTris/ Glycin Puffer , 20 % Methanol

Tabelle 22: Verwendete Primärantikörper. Die dargestellten Verdünnungen der Primärantikörper wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Verdünnungen wurden in 5% Milchpulver angefertigt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht.

Primär-antikörper	Erwartete Proteingröße	Blocking-Puffer	Verdünnung	Detektion	Hersteller	Katalog-nummer
Anti-alpha-Tubulin	50 kDA	5% Milchpulver	1:10.000	Clarity Western ECL	Abcam	ab4074
Anti-cleaved PARP	89 kDA	5% Milchpulver	1:500	Super Signal West Femto Pierce	Cell Signaling	9541S
Anti-total PARP	116 kDA	5% Milchpulver	1:1.000	Super Signal West Femto Pierce	Cell Signaling	9532S

Tabelle 23: Verwendete Sekundärantikörper. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte in 1% Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Sekundärantikörper	Blocking-Puffer	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Polyclonal Goat Anti-rabbit IgG	1% Milchpulver	1:2.000	Dako	P0448

2.7 Durchflusszytometrie

Tabelle 24: Verwendetes Material für die FACS-Analysen Zellzyklus und Apoptose

Material	Hersteller
Annexin binding buffer (20-fach konzentriert, Verdünnung mit Milliporewasser auf 1-fache Konzentration zur Verwendung)	Miltenyi Biotec
MACSQuant Analyzer	Miltenyi Biotec
Mastermix zur Apoptose-Bestimmung	Siehe Tabelle 25
Mastermix Zellzyklus Puffer (Nicoletti Puffer)	Siehe Tabelle 26
Rundboden-Polystyrolröhrchen	Greiner bio-one

Tabelle 25: Chemikalien für die Herstellung des Mastermixes zur Apoptosebestimmung. Für den Mastermix wurde der 20 x Annexin binding buffer von Miltenyi Biotec mit Milliporewasser auf 1x verdünnt. Für jede Probe wurden jeweils 70µl 1 x Annexin binding buffer benötigt. Dazu wurden 2,5 µl Annexin V FITC-Konjugat und 7,5 µl Propidiumiodid hinzugefügt.

Material	Hersteller
Annexin binding buffer (20-fach konzentriert, Verdünnung mit Milliporewasser auf 1-fache Konzentration zur Verwendung)	Miltenyi Biotec
Annexin V FITC (fluorescein isothiocyanate conjugate)	Miltenyi Biotec
Propidiumiodid (PI) (2 mg/ml in DPBS)	Sigma-Aldrich

Tabelle 26: Chemikalien für die Herstellung des Nicoletti Puffers. Für jede Probe wurden 0,5 ml des Nicoletti Puffer Mastermixes benötigt. Zusätzlich wurden 2 µg/ml Propidiumiodid und 200 µg/ml RNaseA zum Puffer hinzugegeben.

Chemikalien/Reagenzien Nicoletti Puffer	Hersteller
Propidiumiodid (50 µg/ml)	Sigma-Aldrich
Tri-Na-Citrat Dihydrat (0,1 %)	Merck Millipore
Triton X100 (0,1 %)	Sigma-Aldrich

2.8 Allgemein verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Tabelle 27: Allgemein verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte. Die hier gelisteten Materialien und Geräte wurden bei der Arbeit im Labor verwendet. Sie wurden übergreifend für alle dargestellten Arbeiten eingesetzt und sind daher nicht separat in den einzelnen Listen aufgeführt. Plastikverbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner bio-one, Gilson, Costar und Sarstedt bezogen.

Material/Geräte	Hersteller
CanoScan 4400F	Canon
CO ₂ -Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific
Glas-Pasteurpipetten	Brand
Kühlzentrifuge AllegraTM 2IR Centrifuge	Beckmann Coulter
Mehrfachdispenser	Eppendorf
Mikroskope Ts2 und TE2000-S	Nikon Eclipse
Minispin Zentrifuge	Eppendorf
MS2 Minishaker Vortexer	IKA
Pipetus	Hirschmann
Trio-Thermoblock	Biometra
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810	Eppendorf

2.9 Software

Tabelle 28: Verwendete Softwareprogramme für die Aufbereitung und Analyse der Daten

Programm	Hersteller
Bio-Rad CFX Maestro	BioRad
CanoScan Toolbox 5.0	Canon
CompuSyn Version 1.0	CompuSyn Inc.
EndNote X9	Clarivate Analytics
Graphpad Prism 8	Graphpad
Image Lab	BioRad
Light Cycler 96 Software	Roche
MACSQuantify Version 2.11	Miltenyi Biotec
MS Office	Microsoft
MPM6	BioRad
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Scientific

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung und Passage der parentalen UC-Zelllinien

Zur Kultivierung der parentalen UC-Zelllinien wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit Glutamax (stabilisiertes L-Glutamin) verwendet. Vor der Verwendung des Mediums wurde *Fetal Calf Serum* (FCS) im Wasserbad bei 56°C für eine halbe Stunde hitzeinaktiviert und mit einem Anteil von 10% dem Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen mit 12 ml DMEM kultiviert und im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert.

Die Passage der parentalen UCCs erfolgte zwei Mal pro Woche. Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen kurz mit 10 ml DPBS gewaschen. Danach wurde das DPBS wieder abgesaugt und 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%) in die Flasche gegeben. Trypsin entfaltet bei 37°C seine optimale Wirkung, so dass die Kulturflaschen für 2 - 5 Minuten im Brutschrank inkubiert wurden. Das erfolgreiche Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde unter dem Mikroskop beurteilt und die Reaktion des Trypsins durch Zugabe von 6 ml DMEM abgestoppt. Die nun entstandene Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt und bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert. Die Überführung der Zellen in neue Kulturflaschen erfolgte in angepassten Zelllinien-spezifischen Verdünnungen.

3.1.2 Kultivierung und Passage der LTT-Zelllinien

Grundsätzlich erfolgte die Kultivierung und Passage der LTTs gemäß dem Protokoll der parentalen UCCs. Nachfolgend werden die Besonderheiten dargestellt. Die Passage der LTTs erfolgte nur ein Mal pro Woche. Wie auch bei den parentalen UCCs wurden die Zellen gewaschen, mit Trypsin abgelöst und mit DMEM abgestoppt. Abweichend wurden die Zellen nur für ca. 2 Minuten zentrifugiert, um die Cisplatin-gestressten Zellen nicht weiter zu schädigen. Nach erfolgreicher Überführung der Zellsuspensionen in neue Kulturflaschen wurden die Zellen mit Cisplatin behandelt. Die Zelllinien-spezifischen Cisplatin-Konzentrationen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Drei Tage nach der Passage wurde bei allen LTT-Zelllinien ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Medium vollständig abgesaugt und neues DMEM hinzugefügt. Dann erfolgte die erneute Zugabe von Cisplatin.

3.1.3 Kultivierung und Passage der Kontrollzelllinie HBLAK

Die Kontrollzelllinie HBLAK wurde in CnT-Prime Epithelzellkulturmedium kultiviert und im Brutschrank bei 37°C mit einem 5%igen CO₂-Gehalt inkubiert. Zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen für HBLAK, wurden speziell beschichtete 25 cm²-Kulturflaschen, so genannte Advanced TC Flaschen von Greiner bio-one mit 5 ml Medium verwendet. Wie auch die UCCs wurde die HBLAK-Zelllinie zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurde das alte Medium aus der Flasche mit einer Stripette abgesaugt und in einem Falconröhrchen gesammelt. Nachdem die Zellen mit DPBS gewaschen wurden, wurde zum Ablösen der Zellen 2 ml Accutase hinzugegeben und die Zellen für ca. 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Erneut wurde das Ablösen der Zellen im Mikroskop kontrolliert. Da Accutase nicht abgestoppt werden kann, wurde das zuvor gesammelte alte Medium hinzugefügt und die Accutase somit verdünnt. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen gegeben und bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in neuem CnT-Prime Medium resuspendiert und im gewünschten Verhältnis in eine neue Kulturflasche überführt.

3.1.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter wurden die Zellen zunächst aus den Zellkulturflaschen gelöst und zentrifugiert. Die Zellsuspension, die nach erneuter Resuspension und Überführung in neue Zellkulturflaschen zurückblieb, wurde für die Zellzählung verwendet. Dazu wurden 10 µl des Farbstoffs Trypanblau (0,4 %) mit 10 µl Zellsuspension vermischt und anschließend 10 µl der entstandenen Lösung auf eine Zählkammer pipettiert. Die Zählung der Zellen erfolgte durch den automatischen Zellzähler TC20TM von BioRad. Dieser unterscheidet zwischen der Anzahl aller Zellen und der Anzahl lebender Zellen. Für die Berechnungen wurde die Anzahl lebender Zellen verwendet.

3.1.5 Zellaussaat

Zur Durchführung der Versuche wurden die verschiedenen Zelllinien in 96- und 6-Well-Platten ausgesät. Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten wurde pro Zelllinie eine individuelle Zellzahl pro Well festgelegt. Diese sind Tabelle 29 zu entnehmen. Zur Aussaat in 96- oder 6-Well-Platten wurde zunächst die Zellzahlbestimmung durchgeführt. Das benötigte Volumen Zellsuspension wurde berechnet, in ein Falconröhrchen überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. Somit erhielt man das jeweils gewünschte Behandlungsvolumen mit der entsprechenden Zellzahl pro Well. Die Aussaat in 96-Well-Platten wurde mithilfe eines Mehrfachdispensers durchgeführt. Zusätzlich dazu wurden auf jeder Platte 2 – 4 Wells nur mit 50 µl Medium gefüllt, um diesen als Leer-Probe (Blank) zu verwenden. Die restlichen freien Wells wurden mit DPBS aufgefüllt, um einen

möglichen Verdampfungseffekt zu minimieren. Nach der Aussaat erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5%igem CO₂-Gehalt für 24 Stunden. Erst im Anschluss wurden weitere Behandlungen durchgeführt.

Tabelle 29: Zelllinien-spezifische Anzahl Zellen, die pro Well ausgesät wurden. Abhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinien wurde die optimale Zellzahl pro 96-Well bzw. 6-Well bestimmt und die Anzahl wie in der dargestellten Tabelle festgelegt. Wenn keine Zellzahl/Well angegeben ist, so wurde die entsprechende Zelllinie im Zuge dieses Projektes nicht in das Format ausgesät.

Platte	Zelllinie	Zellzahl/Well	Aussaatvolumen
96-Well	RT-112	4.000	50 µl
96-Well	T24	1.500	50 µl
96-Well	253J	3.000	50 µl
96-Well	J82	4.000	50 µl
96-Well	UM-UC-3	2.000	50 µl
96-Well	VM-CUB1	2.000	50 µl
96-Well	RT-112 LTT	10.000	50 µl
96-Well	T24 LTT	5.000	50 µl
96-Well	253J LTT	4.000	50 µl
96-Well	J82 LTT	4.000	50 µl
96-Well	HBLAK	2.500	50 µl
6-Well	RT-112	180.000	2.000 µl
6-Well	T24	50.000	2.000 µl
6-Well	253J	135.000	2.000 µl
6-Well	J82	/	/
6-Well	UM-UC-3	/	/
6-Well	VM-CUB1	/	/
6-Well	RT-112 LTT	330.000	2.000 µl
6-Well	T24 LTT	250.000	2.000 µl
6-Well	253J LTT	250.000	2.000 µl
6-Well	J82 LTT	/	/
6-Well	HBLAK	200.000	2.000 µl

3.2 MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität nach der Wirkstoffbehandlung wurde der MTT-Test angewandt. MTT steht dabei für 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, und ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, der membrangängig ist und dadurch in die Zellen eindringen kann. In lebenden Zellen erfolgt durch die mitochondriale Dehydrogenase eine Reduktion des gelben Farbstoffes in das blau-violette wasserunlösliche Formazan, welches nicht mehr membrangängig ist und dadurch in lebenden Zellen akkumuliert. Anschließend kann die Intensität des blauen Farbstoffes photometrisch analysiert werden und dadurch Rückschlüsse auf die quantitative Viabilität der Zellen gezogen werden (Gstraunthaler and Lindl, 2013).

Für den MTT-Test wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät, mit den jeweiligen Wirkstoffen behandelt und inkubiert. 72 Stunden nach der Behandlung wurden mit dem Mehrfachdispenser 10 µl der MTT-Lösung (5 mg/ml PBS) in jedes zu messende Well gegeben (inkl. der Leerprobe/Blank). Anschließend folgte eine erneute Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Die parentalen UCCs wurden für eine Stunde inkubiert, die LTT- Zelllinien wurden für 1,5 Stunden inkubiert. Für die Kontrollzelllinie HBLAK erfolgte eine Inkubation von 4 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurde das Reagenz vollständig abgeschüttet und 50 µl DMSO in jedes Well gegeben. Durch die Zugabe des DMSO wurde der zuvor entstandene blau-violette Farbstoff aus den Zellen freigegeben. Dadurch entstand eine homogen gefärbte Flüssigkeit, die im iMark Microplater Reader gemessen werden konnte. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm (Referenzwellenlänge 750 nm).

3.2.1 Monotherapie und IC₅₀-Bestimmung

Im Zuge dieses Projektes wurden die zwei PARPi Olaparib und Talazoparib, der HDACi Romidepsin, der BETi PLX und das Zytostatikum Cisplatin verwendet. Dazu wurden die Inhibitoren zunächst unter sterilen Bedingungen in 100% DMSO gelöst. Cisplatin war bereits in wässriger Lösung.

Für die vier Inhibitoren Olaparib, Talazoparib, Romidepsin und PLX wurde die mittlere inhibitorische Konzentration, der so genannte IC₅₀-Wert, für jede Zelllinie individuell bestimmt. Der IC₅₀-Wert gibt die Konzentrationen der einzelnen Substanzen an, bei der bei gleichbleibenden Bedingungen 50% der Zellen noch vital sind. Zur Bestimmung des Wertes wurden die einzelnen Zelllinien in 50 µl Medium auf 96-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 5%igem CO₂-Gehalt inkubiert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen in sieben bzw. acht Abstufungen gemäß Tabelle 30. Für jede Konzentration wurden Quadruplikate angefertigt. Als Null-Konzentration wurde DMSO entsprechend der höchsten InhibitorKonzentration verwendet, um die mögliche

zytotoxische Wirkung von DMSO offen zu legen und bei der anschließenden MTT-Analyse zu berücksichtigen.

Tabelle 30: Inhibitor-Konzentrationen zur Bestimmung der Zelllinien-spezifischen IC₅₀-Werte.

Die Tabelle zeigt die Wirkstoffklassen, die einzelnen Wirkstoffe, sowie die Zelllinien, für die eine IC₅₀-Bestimmung durchgeführt wurde. Die Auswahl geeigneter Konzentrationen basierte auf Angaben aus der Literatur und Erfahrungswerten aus der Arbeitsgruppe. Achtung: Für den BETi und die beiden PARPi sind die Angaben in µM, für den HDACi in nM angegeben.

Wirkstoff	Wirkstoff	Zelllinie	Inhibitor-Konzentrationen in µM/für Romidepsin in nM							
-klasse										
BETi	PLX51107	RT-112, T24, 253J, J82, RT-112 LTT, T24 LTT, 253J LTT, J82 LTT	0 (DMSO)	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0
HDACi	Romidepsin	RT-112, T24, RT-112 LTT, T24 LTT	0 (DMSO)	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	5,0
PARPi	Olaparib	alle UCCs alle LTTs	0 (DMSO)	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0	50,0	100,0
PARPi	Olaparib	HBLAK	0 (DMSO)	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	20,0	
PARPi	Talazoparib	T24, 253J, J82, T24 LTT, 253J LTT, J82 LTT	0 (DMSO)	0,125	0,25	0,5	0,75	1,0	2,0	3,0
PARPi	Talazoparib	RT-112, RT-112 LTT	0 (DMSO)	0,05	1,0	5,0	10,0	15,0	20,0	50,0

Die Zellen wurden nach der Behandlung für 72 Stunden erneut inkubiert und im Anschluss ein MTT-Test zur Messung der Zellviabilität durchgeführt. Von den Quadruplikaten wurde aus den im MTT-Test gemessenen Werten der Mittelwert gebildet und dieser auf die DMSO-Kontrolle relativiert. Diese Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Mithilfe der Software GraphPad Prism 8 wurden anhand der Daten die IC₅₀-Werte berechnet

und die entsprechenden Graphen erstellt. Die IC_{50} -Werte für die Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB1 und HBLAK für die Wirkstoffe Talazoparib und PLX wurden aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe übernommen (Thy et al., 2021). Darüber hinaus lagen auch die IC_{50} -Werte für die Zelllinien RT-112, T24, 253J, J82 und die entsprechenden LTTs für das Zytostatikum Cisplatin bereits aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe vor und wurden ebenfalls übernommen (Skowron et al., 2018). Alle gemessenen IC_{50} -Werte sind Tabelle 31 zu entnehmen. Aus Gründen der Praktikabilität und Löslichkeitslimitation, wurden teilweise bei weiteren Experimenten angepasste, reduzierte IC_{50} -Werte verwendet. Die tatsächlich verwendeten Dosierungen sind in Tabelle 32 gelistet.

Tabelle 31: Gemessene IC_{50} -Werte der einzelnen Substanzen. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mithilfe eines MTT-Tests. Die mit einem * gekennzeichneten Werte stammen aus Vorarbeiten der AG Harnblase und wurden im Zuge dieses Projektes nicht erneut validiert.

	IC_{50} Olaparib	IC_{50} Talazoparib	IC_{50} PLX51107	IC_{50} Romidepsin	IC_{50} Cisplatin
RT-112	97,2 μ M	25,5 μ M	3,0 μ M	2,5 nM	10,5 μ M*
T24	18,6 μ M	0,8 μ M	2,1 μ M	1,5 nM	3,5 μ M*
253J	51,6 μ M	0,68 μ M	3,2 μ M		4,5 μ M*
J82	52,7 μ M	0,8 μ M	-		1,7 μ M*
RT-112 LTT	80,9 μ M	52,8 μ M	1,3 μ M	2,0 nM	333,0 μ M*
T24 LTT	5,0 μ M	0,12 μ M	0,8 μ M	0,7 nM	82,0 μ M*
253J LTT	43,1 μ M	4,9 μ M	1,3 μ M		83,9 μ M*
J82 LTT	12,1 μ M	0,13 μ M	3,1 μ M		18,8 μ M*
UM-UC-3	11,0 μ M	1,0 μ M*	8,8 μ M*		
VM-CUB1	19,9 μ M	1,0 μ M*	2,0 μ M*		
HBLAK	9,5 μ M	1,0 μ M*	0,6 μ M*		

Tabelle 32: Verwendete IC_{50} -Werte der einzelnen Substanzen. Aufgrund von Löslichkeitslimitationen und besserer Praktikabilität im Labor wurden für alle weiteren Versuche die hier gelisteten IC_{50} -Werte verwendet.

	IC_{50} Olaparib	IC_{50} Talazoparib	IC_{50} PLX51107	IC_{50} Romidepsin	IC_{50} Cisplatin
RT-112	50,0 μ M	25,5 μ M	3,0 μ M	2,5 nM	10,5 μ M
T24	18,0 μ M	0,8 μ M	2,0 μ M	1,5 nM	3,5 μ M
253J	50,0 μ M	0,8 μ M	3,0 μ M		4,5 μ M

J82	50,0 μ M	0,8 μ M	3,0 μ M		1,7 μ M
RT-112 LTT	50,0 μ M	53,0 μ M	1,3 μ M	2,0 nM	333,0 μ M
T24 LTT	7,5 μ M	0,13 μ M	1,3 μ M	0,7 nM	82,0 μ M
253J LTT	50,0 μ M	5,0 μ M	1,3 μ M		83,9 μ M
J82 LTT	7,5 μ M	0,13 μ M	1,3 μ M		18,8 μ M
UM-UC-3	11,0 μ M		8,8 μ M		
VM-CUB1	19,9 μ M		2,0 μ M		
HBLAK	9,5 μ M		0,6 μ M		

3.2.2 Kombinationstherapie und Synergieanalyse

Um herauszufinden, ob PARPi in Kombination mit anderen epigenetischen Inhibitoren bzw. dem Zytostatikum Cisplatin einen synergistischen Effekt auf die Zellviabilität haben, wurden Kombinationstherapien und eine anschließende Synergieanalyse durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Zelllinien zunächst in 96-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂). Im Anschluss erfolgte die Behandlung gemäß des in Tabelle 33 dargestellten Schemas in Form einer Diagonalen aus festen Verhältnissen der IC₅₀-Werte als Vierfachwerte.

Tabelle 33: Behandlungsschema für die Kombination zweier Wirkstoffe. Für die Synergieanalyse wurde die Kombinationstherapie in Form eines diagonalen Behandlungsschemas durchgeführt. Die dargestellten Kreuze (X) markieren die angewandten Kombinationen aus Wirkstoff 1 und Wirkstoff 2. Die IC₅₀-Werte pro Wirkstoff und Zelllinie sind Tabelle 32 zu entnehmen.

		Wirkstoff 1						
		0 x IC ₅₀	0,125 x IC ₅₀	0,25 x IC ₅₀	0,5 x IC ₅₀	0,75 x IC ₅₀	1,0 x IC ₅₀	1,5 x IC ₅₀
Wirkstoff 2	0 x IC ₅₀	X						
	0,125 x IC ₅₀		X					
	0,25 x IC ₅₀			X				
	0,5 x IC ₅₀				X			
	0,75 x IC ₅₀					X		
	1,0 x IC ₅₀						X	
	1,5 x IC ₅₀							X

Die sieben Konzentrationsabstufungen wurden ausgehend von den jeweiligen IC₅₀-Werten der einzelnen Substanzen und der individuellen Zelllinien berechnet und in 50 μ l Medium entsprechend der gewünschten Endkonzentration verdünnt. Zusätzlich zu der

Kombinationsbehandlung wurden die beiden Wirkstoffe in den gleichen Konzentrationsabstufungen auch als Monotherapie angewandt, um einen direkten Vergleich zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung zu erhalten und um die Synergieanalyse durchführen zu können. Anhand der auf die Kontrolle normierten Ergebnisse wurde mithilfe der Software CompuSyn die Synergieanalyse nach Chou-Talalay durchgeführt (Chou, 2010). Aus diesen Daten errechnete die Software einen so genannten *Combination-Index* (CI) und stellte diesen in einem CI-Plot dar. Die entstehende Graphik zeigte, ob die Kombination der beiden Wirkstoffe einen synergistischen ($CI < 1$), einen additiven ($CI = 1$) oder einen antagonistischen Effekt ($CI > 1$) hatte. Im Falle eines synergistischen Effektes zweier Substanzen ($CI < 1$) wurde nachfolgend die vollständige Kombinationsmatrix angefertigt. Diese entspricht des in Tabelle 33 dargestellten Schemas mit der Änderung, dass nicht nur die diagonalen Kombinationen, sondern alle möglichen Kombinationen (nicht feste IC_{50} -Verhältnisse) in Quadruplikaten auf die Zellen angewandt wurden. Nach einer 72-stündigen Inkubation nach Behandlung, erfolgte die MTT-Analyse und die anschließende Auswertung der Daten mit Microsoft Excel. Dazu wurden die Mittelwerte der Vierfachwerte errechnet und diese auf die Kontrolle relativiert. Die Graphen wurden ebenfalls mit Excel erstellt.

3.3 Klonogenitätstest und Giemsa/ Kristallviolett Färbung

Der Klonogenitätstest diente dazu die Langzeitproliferation der Zellen mit und ohne die unterschiedlichen Behandlungen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Zellreihen zunächst gemäß Tabelle 29 in 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden bei 37° und 5%igem CO_2 inkubiert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit den gewünschten Substanzen und Konzentrationen, sowie der jeweiligen DMSO-Kontrolle. Anschließend wurden die behandelten Zellen wiederum für 72 Stunden inkubiert. Im Anschluss folgte die Ernte der Zellen und die verdünnte Aussaat auf neue 6-Well-Platten. Dazu wurde das alte Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit DPBS kurz gewaschen. Danach wurden 0,3 ml Trypsin auf die Wells gegeben und diese kurz inkubiert, um die Zellen abzulösen. Durch die Zugabe von Medium wurde die Reaktion des Trypsins abgestoppt und die abgelösten Zellen in Falconröhrchen überführt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen der DMSO-Probe pro ml bestimmt. Ausgehend von diesem Wert wurde das benötigte Volumen Zellsuspension berechnet, um 1.000 Zellen pro 6-Well zu erhalten. Das für die DMSO-Probe errechnete Volumen wurde ohne weitere Zellzählung auch für die behandelten Zellen übernommen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In jedes 6-Well wurden dann 2 ml Medium vorgelegt und das entsprechende Volumen Zellsuspension in Triplikaten hinzugefügt. Anschließend wurden die 6-Well-Platten wieder im Inkubator bei $37^{\circ}C$ und 5% CO_2 gelagert.

Die Inkubationszeit variierte zwischen 9 und 15 Tagen bei den UCCs und den LTTs. Die Kontrollzelllinie musste für 25 Tagen inkubiert werden. Ausschlaggebend für die Inkubationszeit war die Bildung von einzelnen Kolonien in der DMSO-Kontrolle, ohne dass diese konfluent wurden. Für die Fixierung und Anfärbung der Zellkolonien wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Danach folgte ein erneuter Waschschriff mit 3 ml pro Well DPBS und 100%igem Methanol in einer 1:1 Mischlösung. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml reinem Methanol bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten fixiert. Nach der Fixierung folgte die Färbung der Zellen mit Giemsa-Lösung. Dazu wurden die Wells mit der Färbelösung bedeckt, ca. 2 Minuten bei RT inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Da die Kontrollzelllinie HBLAK sich nur sehr schwer anfärben ließ, wurde bei dieser Zelllinie mit analog 0,1%iger Kristallviolettlösung (gelöst in DPBS) nachgefärbt. Die Dokumentation der Kolonien erfolgte im Anschluss mit dem Scanner Canon 4400F.

3.4 RNA-Analysen

3.4.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA aus den Zellen wurden die gewünschten Zelllinien zunächst in 6-Wells ausgesät und nach 24 Stunden mit den verschiedenen Substanzen behandelt. In diesem Projekt erfolgte die RNA-Isolierung für die Zelllinien RT-112, T24, 253J, RT-112 LTT, T24 LTT und 253J LTT mit den folgenden Behandlungen: DMSO (Kontrolle), 1 x IC₅₀ Olaparib, 1 x IC₅₀ PLX und die Kombination aus 1 x IC₅₀ Olaparib + 1 x IC₅₀ PLX. Der IC₅₀ für die jeweiligen Zelllinien und Wirkstoffe ist Tabelle 32 zu entnehmen. Die anschließende Durchführung der RNA-Isolation wurde mit dem QIAshredder® und dem RNeasy Mini Kit® von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Da die Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits aus den 6-Well-Platten gelöst waren, wurde abweichend von den Angaben im Handbuch der von Qiagen gelieferte RLT-Puffer nicht auf die Wells pipettiert, sondern direkt in die Falconröhrchen gegeben. Der von Qiagen optional empfohlene Schritt des DNase-Verdau wurde bei allen Proben durchgeführt. Dafür wurde das RNase-free DNase Set von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Nach abschließender Elution der RNA in 80 µl RNase-freiem Wasser erfolgte die Messung des RNA-Gehaltes sowie der Reinheit der RNA mittels NanoDrop®. Die Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

3.4.2 Reverse Transkription

Mithilfe der Reversen Transkription wurde die isolierte RNA aus den Zellen in *complementary DNA* (cDNA) umgewandelt, um im Anschluss eine *quantitative real time* (=Echtzeit) Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) durchführen zu können. Dafür wurde das FastGene® Scriptase II cDNA Kit von Nippon Genetics nach Herstellerangaben verwendet. Für

jede Probe wurde 1 µg RNA eingesetzt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die FastGene® Scriptase II bereits vor der 2-minütigen Inkubation bei 42°C zu den Proben hinzugefügt. Der optionale Schritt einer anschließenden 2-minütigen Inkubation bei 25°C wurde ebenfalls durchgeführt. Nach der abgeschlossenen Umwandlung wurde die fertige cDNA bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.4.3 qRT-PCR

Zur Bestimmung der quantitativen Expression bestimmter Gene in der zuvor aus den Proben gewonnenen cDNA wurde die qRT-PCR durchgeführt. Dabei erfolgen die Vervielfältigung und die Fluoreszenzmarkierung der Nukleinsäuren zeitgleich mit der Quantifizierung der Gene. Der sogenannte *quantification cycle* Wert (Cq-Wert) gibt dabei den PCR-Zyklus an, in dem die gemessene Fluoreszenz des gesuchten Gen-Abschnitts die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Je niedriger dieser Wert ist, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal und desto höher ist somit die Genexpression.

Für die qRT-PCR wurden die zuvor hergestellten cDNA-Proben zunächst in einem Verhältnis von 1:20 mit sterilem Wasser verdünnt. Zusätzlich zu den Proben wurde bei jeder Messung eine für das zu messende Gen festgelegte Standardreihe mitgemessen. Diese gab Aufschluss über die Qualität der durchgeführten qRT-PCR und ermöglichte eine interne Quantifizierung der Expression. Der Standard wurde 1:20, 1:200 und 1:2.000 mit sterilem Wasser verdünnt. Außerdem wurde bei jeder Messung auch eine H₂O Negativ-Kontrolle angefertigt. Der jeweils verwendete Primer, sowie die Primer-spezifischen Temperaturen, verwendeten Reagenzien, sowie der Standard sind Tabelle 13 zu entnehmen. Die zu messenden Proben, sowie die Standardreihe wurde in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Dazu wurden zunächst 18 µl des Mastermixes in jedes Well pipettiert (siehe Tabelle 12). Danach wurden jeweils 2 µl der verdünnten cDNA hinzugegeben. Die Messung der 96-Well-Platten erfolgte mit dem Light Cycler® 96. Die dabei gewählten Einstellungen (Anzahl Amplifikationsschritte und Temperatur) sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Light Cycler® 96 Software verwendet. Diese lieferte anhand der Cq-Werte und der Standardreihe eine relative Konzentration in der jeweiligen Probe. Zum Ausgleich von Pipettierungsungenauigkeiten wurde zusätzlich die Expression des Haushaltsgens TBP (TATA-Box bindendes Protein) gemessen und die Werte des Zielgens der jeweiligen Probe darauf normiert. Zur besseren Visualisierung von Expressionsveränderungen nach Behandlung wurde der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe errechnet. Dafür wurde aus den Triplikaten der DMSO-Probe der Mittelwert errechnet und die relativierten behandelten Proben durch diesen Mittelwert dividiert. Anschließend wurde für jedes Ergebnis der Logarithmus zur

Basis zwei berechnet. Aus den jeweiligen Triplikaten konnte abschließend der Mittelwert, sowie die Standardabweichung errechnet werden.

3.4.4 Auswertung der RNAseq-Daten

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe lagen umfassende Transkriptomdaten vor, die mittels einer RNA-Sequenzierung (RNAseq) erstellt wurden. Die dafür benötigten Proben wurden von der Arbeitsgruppe hergestellt und vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum Düsseldorf (BMFZ) sequenziert. Für die Sequenzierung wurde die isolierte RNA folgender Zelllinien bereitgestellt: VM-CUB1, UM-UC-3, RT-112, T24, J82, RT-112 LTT, T24 LTT, J82 LTT und HBLAK. Darüber hinaus wurden außerdem Proben der Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und HBLAK isoliert und sequenziert, die zuvor mit dem BETi PLX behandelt wurden. Dafür wurde der IC_{50} -Wert der jeweiligen Zelllinie verwendet. Die vom BMFZ gemessenen Hochdurchsatzdaten wurden der Arbeitsgruppe in Form von Excel-Listen zur Verfügung gestellt. Neben den Rohdaten wurden die Daten in Relation zu Kontrollen gesetzt, um somit Genexpressionsveränderungen ermitteln zu können. Die unbehandelten parentalen UCCs wurden in Relation zur HBLAK-Kontrollzelllinie gesetzt. Die Cisplatin-resistenten LTTs wurden relativ zu ihren jeweiligen parentalen Zelllinien verrechnet. Die PLX-behandelten Zelllinien wurden auf ihre jeweiligen DMSO-Kontrollproben relativiert. Die daraus ermittelten Genexpressionsveränderungen wurden als FC angegeben. Alle statistisch signifikanten Veränderungen wurden aufgelistet. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ bei Bonferroni-Adjustierung als Schwellenwert festgelegt. Bei der darauf aufbauenden Analyse der Daten wurden alle Genexpressionen mit einem $FC \geq \pm 1,5$ verwendet, da man hier von einer biologischen Relevanz ausgehen kann.

3.5 Protein-Analysen

3.5.1 Protein-Isolierung

Für die Isolierung der Proteine aus Zellen wurden die gewünschten Zelllinien in 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen. Analog zur RNA-Isolierung erfolgte die Protein-Isolierung für die Zelllinien RT-112, T24, 253J, RT-112 LTT, T24 LTT und 253J LTT mit den jeweiligen Behandlungen DMSO (Kontrolle), 1 x IC_{50} Olaparib, 1 x IC_{50} PLX und 1 x IC_{50} Olaparib + 1 x IC_{50} PLX. Die verwendeten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 32 gelistet. 72 Stunden nach der Behandlung wurde das Medium aus den 6-Well abgessaugt und die Zellen mit 2 ml DPBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden die 6-Well-Platten auf Eis gelegt und mit 80 μ l Lysis-Puffer (RIPA-Puffer + Protease-Inhibitor und Phosphatase Inhibitor beide im Verhältnis 1:100 zum RIPA-Puffer) pro Well behandelt. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Well-Boden gelöst, zusammengeschoben und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Um

die Zellen vollständig zu lysieren, wurden diese im Reaktionsgefäß noch einmal ausgiebig auf dem Vortexmischer geschüttelt. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben erneut auf dem Vortexmischer geschüttelt und anschließend in der Kühlzentrifuge für 10 Minuten bei 12.000g bei 4°C zentrifugiert, um mögliche Zelltrümmer aus der Probe zu entfernen. Der dabei entstandene Überstand wurde in neue gekühlte Mikroreaktionsgefäße transferiert und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.5.2 BCA-Test

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde ein BCA-Protein-Test durchgeführt. Der Test beruht darauf, dass Peptidbindungen an zweiwertige Kupferionen binden, die bei alkalischem pH-Wert reduziert werden. Die hinzugegebene Bicinchoninsäure (BCA) bindet diese freien Kupferionen, wodurch ein blau-violetter Farbkomplex entsteht, der photometrisch gemessen werden kann. Je mehr Peptide bzw. Proteine vorhanden sind, desto intensiver ist die Färbung beim BCA-Test (Rehm and Letzel, 2010).

Für die Durchführung des BCA-Tests wurde das Pierce BCA Protein-Assay-Kit von Thermo Fisher verwendet. Zunächst wurde eine Standardreihe aus sieben Verdünnungen angefertigt. Dazu wurde Bovines Serumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 2.000 µg/ml als erster Standard verwendet. Dieser wurde jeweils 1:2 mit RIPA-Puffer weiter verdünnt, so dass eine Verdünnungsreihe mit folgenden Werten entstand: 2.000 µg/ml, 1.000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 63 µg/ml und 32 µg/ml. Die zu messenden Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit RIPA-Puffer verdünnt, da das verwendete Messgerät nur bis zu einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml valide Messwerte lieferte. Zur Herstellung des BCA-Mixes wurde Reagenz B aus dem verwendeten Kit im Verhältnis 1:50 in Reagenz A verdünnt. Anschließend wurden die Standardreihe, die zu messenden Proben, sowie ein Nullwert (RIPA-Puffer) in Duplikaten (10 µl pro Well) auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Jedem Well wurden 200 µl des BCA-Mixes hinzugefügt und die Platte anschließend 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte mit dem Microplate reader iMark bei 595 nm. Die vom Gerät ausgegebene Proteinkonzentration pro Probe wurde mit dem Verdünnungsfaktor fünf multipliziert und aus den jeweiligen Duplikaten der Mittelwert bestimmt.

3.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-Page) werden Proteine in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Dazu wurden aus den zuvor isolierten Proteinen jeweils 20 µg mit RIPA-Puffer auf 18 µl aufgefüllt. Grundlage für die Berechnung des dafür benötigten Probenvolumens bildeten die Werte des zuvor

durchgeführten BCA-Tests. Anschließend wurde zu jeder Probe 6 µl Roti-Load1-Probenpuffer (4-fach konzentriert) hinzugegeben, so dass die Gesamtmenge pro Probe 24 µl war. Danach folgte eine 5-minütige Denaturierung der Proben bei 95°C im Trio-Thermoblock. Im Anschluss wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel angefertigt. Die fertigen Gele wurden in eine vertikale Laufkammer eingespannt, die mit 4°C kaltem Bio Rad Elektrophorese Laufpuffer aufgefüllt wurde. Die Kammer selbst wurde ebenfalls auf Eis gelagert, um einer möglichen Überhitzung durch das elektrische Feld entgegenzuwirken. Anschließend wurden zunächst 7 µl der *PageRuler Prestained Protein Ladder* als Größenstandard in eine der Geltaschen pipettiert. Anschließend wurden jeweils 22 µl der gekühlten Proben in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Gele erfolgte zunächst bei 100 Volt für 15 Minuten. Danach wurde die Spannung für weitere ca. 90 Minuten auf 180 Volt erhöht.

Tabelle 34: Zusammensetzung eines 10%igen Polyacrylamidgels. Die Angaben sind aufgeteilt in Trenngel und Sammelgel. Bei der Herstellung wurde zunächst das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen. Nach ca. 20 Minuten wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Gelkamm eingeführt. Nach weiteren ca. 20 Minuten waren beide Gele vollständig auspolymerisiert, so dass der Gelkamm entfernt und die Gelkammern mit den Proben beladen werden konnten.

Material	Volumen für zwei 10%ige Polyacrylamidgele (Trenngel)	Volumen für zwei Polyacrylamidgele (Sammelgel)
H ₂ O	4 ml	3,4 ml
PAA 30 %	3,3 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	/
1,0 M Tris pH 6,8	/	0,63 ml
10 % SDS in dest. H ₂ O	0,1 ml	0,05 ml
10 % APS in dest. H ₂ O	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml

3.5.4 Western Blot

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit dem Western Blot Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) (0,45 µm) übertragen, um spezifische Proteine mittels Antikörper nachweisen zu können. Dafür wurde die PVDF-Membran von Merck Millipore zunächst für eine Minute in 100%igem

Methanol getränkt und anschließend für zwei Minuten in H₂O gewaschen. Danach wurde die Membran für ca. 5 Minuten in *Blotting Puffer* getränkt. Pro Membran wurden außerdem vier Whatman-Papiere vorbereitet, indem sie für ca. 5 Minuten in *Blotting Puffer* inkubiert wurden. Anschließend wurde der Blot wie folgt zusammengebaut, bevor er in die *Blotting*-Kassette des Semidry Blotters von Bio Rad überführt wurde: 2 x Whatman-Papier, 1 x PVDF-Membran, 1 x SDS-Polyacrylamidgel, 2 x Whatman-Papier. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 25 Volt und 2,5 Ampere für 30 Minuten.

Nach dem Transfer wurden die Membranen für eine Stunde bei RT in 5%iger Milch geschwenkt, so dass alle unspezifischen Antikörperbindungsstellen weitestgehend blockiert wurden. Die 5%ige Milch wurde in TBS-T verdünnt. Nach der einstündigen Inkubation wurde der Primärantikörper entsprechend den Verdünnungen nach Herstellerangaben in 5%ige Milch gegeben und die Membranen darin über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen zunächst für insgesamt 40 Minuten in TBS-T gewaschen. Danach folgte die Behandlung mit dem Sekundärantikörper. Dazu wurde der Sekundärantikörper in 1%iger Milch in TBS-T verdünnt und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift für insgesamt 40 Minuten in TBS-T. Alle verwendeten Antikörper sowie die Antikörper-spezifischen Substanzen und Verfahren sind Tabelle 22 und Tabelle 23 zu entnehmen.

Zur Detektion wurde abhängig vom Antikörper das Clarity Western ECL-Substrat von BioRad oder das Super Signal West Femto Pierce von Thermo Fisher verwendet. Die vom Hersteller gelieferten Substanzen A und B wurden dafür 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Danach folgte eine 5-minütige Inkubation im Dunkeln. Anschließend wurde die Detektion im Chemolumineszenz Detektor Chemi Doc von BioRad durchgeführt. Die drei gemessenen Antikörper wurden nacheinander ohne vorheriges Stripping inkubiert und detektiert.

3.6 Durchflusszytometrie

3.6.1 Zellzyklusanalyse

Im weiteren Verlauf des Projektes sollte untersucht werden, welchen Einfluss die gewählten Einzel- und Kombinationsbehandlungen auf den Zellzyklus der UCCs und LTTs haben. Dafür wurde eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Zur Einteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen Sub-G1, G1, S und G2/Mitose wurden die Proben mit Propidium-Iodid (PI) behandelt. Dieses interkaliert in die DNA der Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen ein unterschiedlicher DNA-Gehalt vorliegt, kann das Fluoreszenzsignal zur Einteilung in Zellzyklusphasen verwendet werden. Dafür wurden die Zelllinien in 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen gemäß dem oben dargestellten Vorgehen,

sowie eine 72-stündige Inkubation. Danach folgte die enzymatische Ablösung der Zellen aus den Wells und die Überführung in Polystyrolröhrchen. Die nach mehreren Waschschritten und Zentrifugation entstandenen Zellpellets wurde dann in 500 µl Nicoletti-Puffer mit 2 µg/ml PI und 200 µg/ml RNase resuspendiert und ausgiebig auf dem Vortexmischer geschüttelt. Danach folgte eine 10-minütige Inkubation bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen abgedunkelt auf Eis gelagert und vor jeder Messung noch einmal gründlich auf dem Vortexmischer geschüttelt, um Verklumpungen der Zellen zu vermeiden. Die Messung des Zellzyklus wurde mit dem MACSQuant® Analyser durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der MACSQuant® Software.

3.6.2 Apoptoseanalyse

Die Apoptoseanalyse mittels Durchflusszytometrie basiert auf der spezifischen Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin. Dieses befindet sich an der Innenseite der Zellmembranen. Sind die Zellen intakt, also nicht apoptotisch, so kann Annexin V nicht an diese binden (Zellstatus = lebendig). Im Falle eines apoptotischen Vorgangs wird das Phosphatidylserin nach außen gestülpt, so dass das Annexin V daran bindet und in der Fluoreszenzmessung detektiert wird (Zellstatus = frühe Apoptose). Eine weitere Unterscheidung erfolgt mit der PI-Färbung. PI kann nur in Zellen mit einer durchlässigen Membran eindringen. In diesem Fall sind die Zellen bereits in der späten Apoptose bzw. nekrotisch. Nekrotische Zellen zeigen sich zusätzlich Annexin negativ.

Für die Messung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen erneut in 6-Well-Platten ausgesät und mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen für die Messung in der Durchflusszytometrie vorbereitet. Dafür wurden die Zellen aus den Wells gelöst, gewaschen und zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden in 1 ml Annexin V-Binding Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut bei 700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das nun entstandene Zellpellet wurde in 70 µl Annexin V-Binding Puffer mit 2,5 µl Annexin V FITC-Konjugat und 7,5 µl PI pro Reagenzglas resuspendiert, auf dem Vortexmischer geschüttelt und anschließend für 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden noch einmal 0,5 ml Annexin V-Binding Puffer zu jeder Probe hinzugegeben und die Zellen abgedunkelt auf Eis gelagert. Vor jeder Messung wurden die Proben ausgiebig auf dem Vortexmischer geschüttelt, um mögliche Zellklumpen zu lösen. Die Messung erfolgte mit dem MACSQuant® Analyser. Die anschließende Auswertung wurde mit der MACSQuant® Software durchgeführt.

3.7 Statistische Auswertung

Bei den Versuchen wurden die in den jeweiligen Kapiteln beschriebenen Mehrfachmessungen angefertigt und bei der Auswertung die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Diese sind in den Ergebnissen dargestellt. Die Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Auf Basis dieser Werte wurden die IC_{50} -Werte mit GraphPad Prism 8 berechnet. Die Synergieanalyse wurden mit der CompuSyn Software Version 1.0 durchgeführt.

Statistische Vergleiche zwischen verschiedenen Gruppen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 8 durchgeführt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde dabei als signifikant gewertet. Für die Berechnung der p-Werte wurde die *one-way* ANOVA Analyse angewandt. Der Tukey-Test diente der Korrektur für multiples Testen.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl eines geeigneten PARPi für die Behandlung der UC-Zelllinien

Um den Effekt von PARPi auf UCCs zu untersuchen, wurden die vier parentalen Zelllinien RT-112, T24, 253J und J82 sowie ihre LTT-Sublinien mit dem PARPi Olaparib behandelt und der Effekt auf die Viabilität mittels MTT-Test ausgewertet (Abb. 4).

Wie erwartet zeigten die untersuchten parentalen UCCs keine hohe Sensitivität gegenüber der alleinigen Behandlung mit dem PARPi Olaparib. Am sensitivsten zeigte sich die Zelllinie T24 mit einem gemessenen IC_{50} -Wert von 18,6 μM , gefolgt von 253J mit 51,6 μM und J82 mit 52,7 μM . RT-112 erwies sich als weitaus resistenter gegenüber der Behandlung mit einem IC_{50} von 97,2 μM . Auch die jeweiligen Cisplatin-resistenten Sublinien der Zelllinien wurden mit Olaparib behandelt und ihre IC_{50} -Werte bestimmt. Auch hier wurden hohe Konzentrationen des PARPi benötigt, um einen alleinigen Effekt zu erzielen. Wie auch bei den parentalen Zelllinien reagierte T24 LTT am sensitivsten mit einem IC_{50} von 5,0 μM , gefolgt von J82 LTT mit 12,1 μM und 253J LTT mit 43,1 μM . Auch hier benötigte RT-112 LTT mit einem IC_{50} -Wert von 80,9 μM die höchste Konzentration im Gegensatz zu den anderen LTT-Zelllinien. Auffällig war, dass alle Cisplatin-resistenten Zelllinien einen niedrigeren IC_{50} -Wert zeigten als ihre parentalen Sublinien, also sensitiver gegenüber der Behandlung mit einem PARPi waren. Besonders deutlich war dies in der Zelllinie J82 zu beobachten, die einen Konzentrationsunterschied von über 40 μM Olaparib zwischen der parentalen und der LTT-Zelllinie zeigte. Mit Blick darauf, dass in diesem Projekt vor allem die Untersuchung neuer Behandlungsmöglichkeiten Cisplatin-resistenter UCCs im Vordergrund stand, konnte der PARPi Olaparib somit als vielversprechende Substanz weiterverwendet werden.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden bereits erste Versuche mit dem PARPi Talazoparib und den UCCs UM-UC-3 und VM-CUB1 durchgeführt (Thy et al., 2021). Um an die Ergebnisse dieser Arbeit anknüpfen zu können und eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen wurden auch UM-UC-3 und VM-CUB1 mit Olaparib behandelt und ihre IC_{50} -Werte erneut bestimmt: UM-UC-3 $IC_{50} = 11,0 \mu\text{M}$, VM-CUB1 $IC_{50} = 19,9 \mu\text{M}$.

Als normale uroepitheliale Kontrollzelllinie wurden kommerziell erhältliche HBLAK-Zellen verwendet. Die IC_{50} -Bestimmung mit Olaparib ergab eine Konzentration von 9,5 μM . Somit muss man davon ausgehen, dass benigne Urothelzellen sensitiver auf die Mono-Behandlung mit PARPi reagieren als die meisten UCCs.

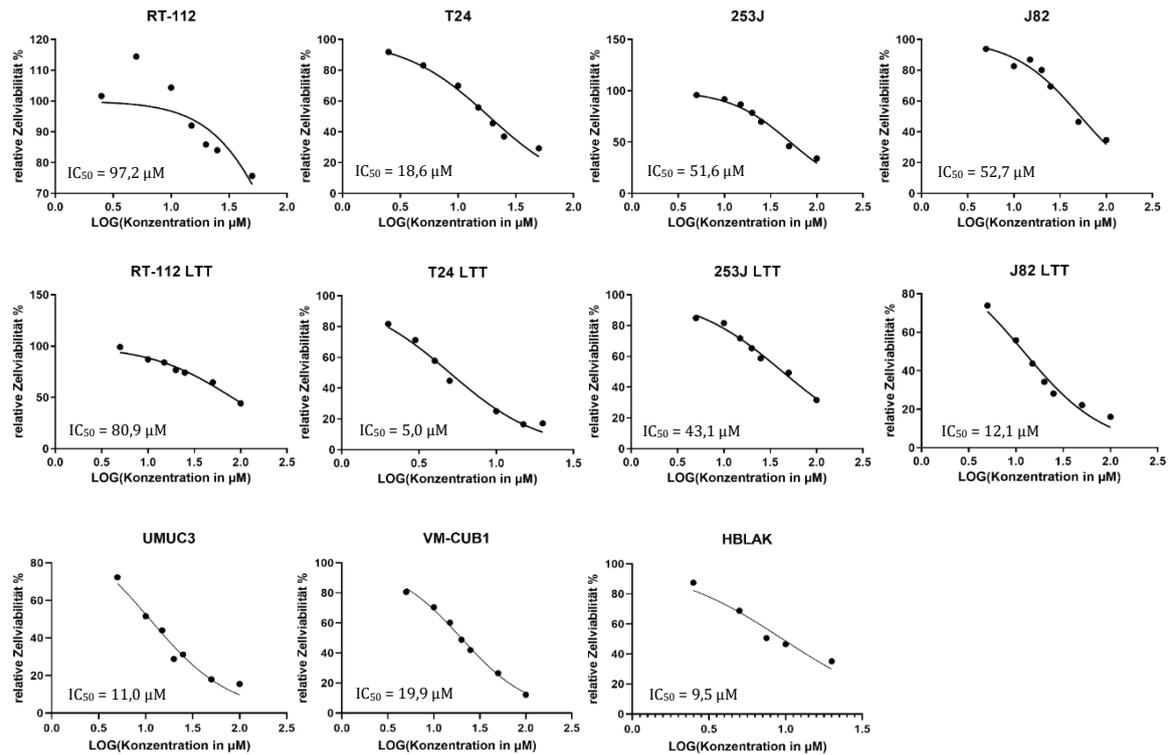


Abb. 4: Dosiswirkungskurven nach Behandlung der parentalen und Cisplatin-resistenten UCCs, sowie HBLAK mit Olaparib. Dargestellt ist die logarithmierte Konzentration des PARPi Olaparib auf der x-Achse und die jeweilige relative Zellviabilität auf der y-Achse. Die Zellviabilität der behandelten Ansätze wurde auf die der Lösungsmittelkontrolle normiert. Die Graphen zeigen die Zellviabilität in Abhängigkeit zur Olaparib-Konzentration der Cisplatin-sensitiven und -resistenten UC-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK, sowie die jeweiligen Zelllinien-spezifischen IC_{50} -Werte.

4.2 Wirksamkeit von PARPi in Kombination mit Cisplatin

Ein PARPi als Inhibitor der DNA-Maschinerie könnte auch in Kombination mit einer DNA-schädigenden Substanz wie Cisplatin eine gute zytotoxische Wirksamkeit zeigen. Die IC_{50} -Werte für Cisplatin für die in diesem Projekt verwendeten acht Zelllinien waren bereits bekannt (Tabelle 32). Für die Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin wurden die individuellen IC_{50} -Werte für die beiden Substanzen für die einzelnen Zelllinien mit folgenden Werten multipliziert: $IC_{50} \times 0$, $IC_{50} \times 0,125$, $IC_{50} \times 0,25$, $IC_{50} \times 0,5$, $IC_{50} \times 0,75$, $IC_{50} \times 1,0$ und $IC_{50} \times 1,5$. Tabelle 35 zeigt beispielhaft die Berechnung der Konzentrationen der Mono- und Kombinationstherapie für die Zelllinie 253J.

Tabelle 35: Berechnung der Konzentrationen für Olaparib und Cisplatin für 253J. Dargestellt ist beispielhaft die Berechnung der Einzel- und Kombinationskonzentrationen für die Behandlung der Zelllinie 253J mit Olaparib und Cisplatin. Dabei wurde der jeweilige IC₅₀-Wert für 253J mit dem entsprechenden Faktor multipliziert.

Multiplikationsfaktor	xIC ₅₀ Olaparib*	xIC ₅₀ Cisplatin**	Kombinationsbehandlung
0 (Kontrolle)	0 µM	0 µM	0 µM Olaparib + 0 µM Cisplatin
0,125	6,25 µM	0,56 µM	6,25 µM Olaparib + 0,56 µM Cisplatin
0,25	12,5 µM	1,13 µM	12,6 µM Olaparib + 1,13 µM Cisplatin
0,5	25,0 µM	2,25 µM	25,0 µM Olaparib + 2,25 µM Cisplatin
0,75	37,5 µM	3,38 µM	37,5 µM Olaparib + 3,38 µM Cisplatin
1,0	50,0 µM	4,5 µM	50,0 µM Olaparib + 4,5 µM Cisplatin
1,5	75,0 µM	6,75 µM	75,0 µM Olaparib + 6,75 µM Cisplatin

* IC₅₀ Olaparib für 253J = 50,0 µM

** IC₅₀ Cisplatin für 253J = 4,5 µM

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test quantifiziert. In Abb. 5 ist beispielhaft die MTT-Analyse der Kombinationsbehandlung auf die Zelllinie 253J abgebildet. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass mit steigenden Konzentrationen der beiden Substanzen die relative Viabilität der Zellen sowohl bei der Mono- als auch bei der Kombinationstherapie abnahm. Bei einer Konzentration von 1 x IC₅₀ lag die relative Viabilität wie zu erwarten bei beiden Monotherapien bei ca. 50% (Olaparib = 0,41, Cisplatin = 0,46). Im direkten Vergleich wurde deutlich, dass die Kombination aus 1 x IC₅₀ Olaparib + 1 x IC₅₀ Cisplatin einen stärkeren Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte (= 0,34 relative Viabilität). Aber auch in niedrigeren Dosierungen zeigte sich ein deutlich positiver Effekt der Kombinationstherapie auf die Zellviabilität: Bei einer IC₅₀-Reduktion beider Substanzen um 50%, also 0,5 x IC₅₀ Olaparib + 0,5 x IC₅₀ Cisplatin, konnte bereits eine relative Viabilität von 0,41 erreicht werden.

Mit Hilfe der Chou-Talalay Methode wurde für alle acht behandelten Zelllinien eine Synergieanalyse für die Kombination der beiden Substanzen angefertigt (Abb. 5).

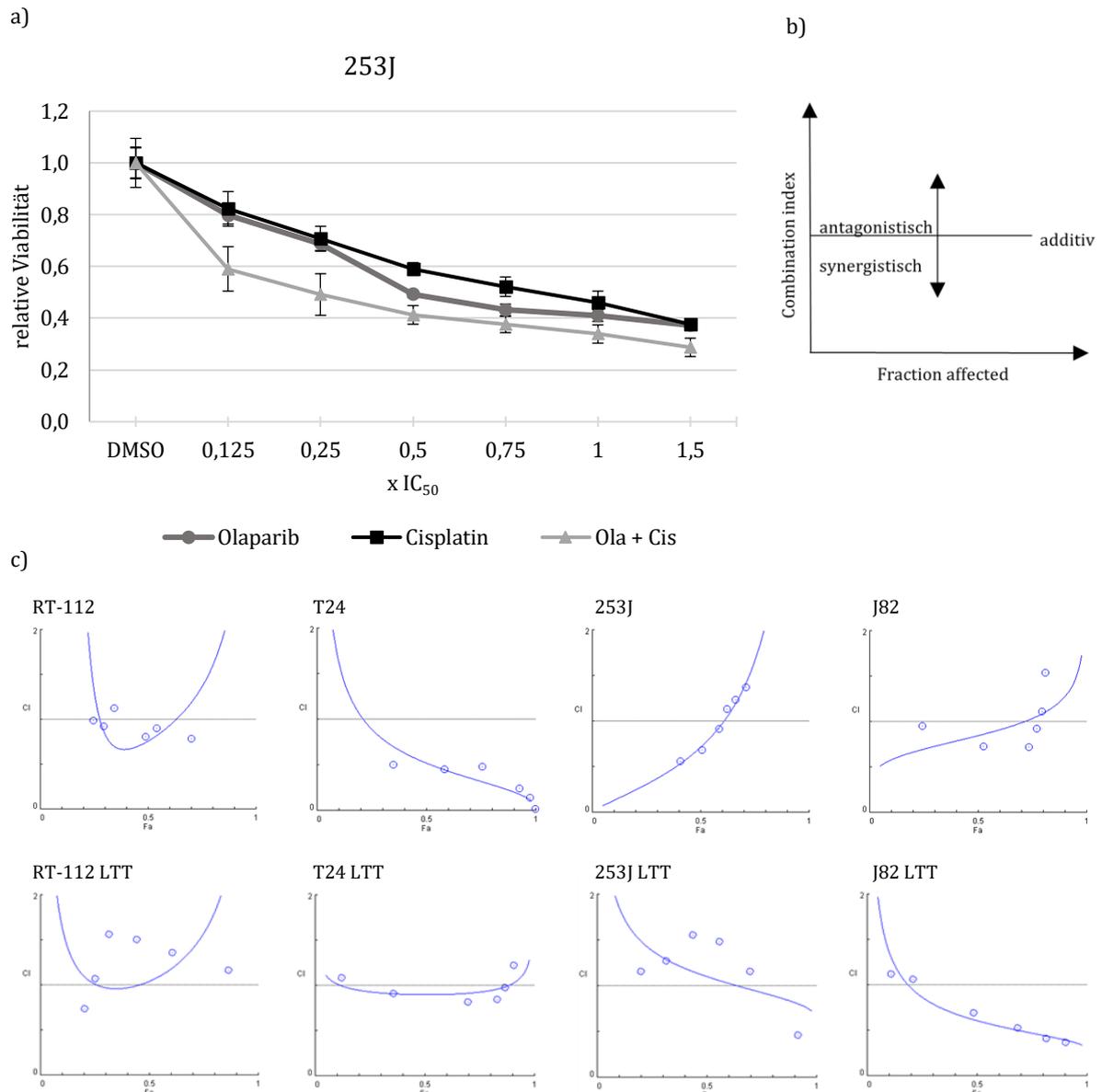


Abb. 5: a) Dosiswirkungskurve der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin auf die Zelllinie 253J. Dargestellt ist der Multiplikationsfaktor des IC₅₀-Wertes der jeweiligen Substanz auf der x-Achse, sowie die relative Viabilität zur DMSO-Kontrolle auf der y-Achse. **b) Schematische Darstellung des Diagramms einer Chou-Talalay Analyse.** Auf der x-Achse ist die *Fraction affected* (1-relative Viabilität = Anzahl der toten Zellen) abgebildet. Auf der y-Achse ist der *Combination Index* (CI) dargestellt. CI < 1 zeigt einen Synergismus, CI = 1 zeigt einen additiven Effekt, CI > 1 zeigt einen antagonistischen Effekt. **c) Chou-Talalay Analyse der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin.** Die obere Reihe zeigt die Ergebnisse der Synergieanalyse der Cisplatin-sensiblen UCCs, die untere Reihe zeigt die Ergebnisse der Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien.

Abb. 5 zeigt, dass vor allem die parentale Zelllinie T24 von der Kombinationstherapie aus Cisplatin und Olaparib profitierte. Hier war ein deutlicher synergistischer Effekt der beiden Substanzen durch die Chou-Talalay Methode feststellbar ($CI < 1$). Bei den drei anderen parentalen Zelllinien zeigte sich ein weniger positiver Kombinationseffekt. Zwar waren einige Punkte des Graphen unterhalb der $CI = 1$ Markierung, doch blieb der starke synergistische Effekt bei diesen Zelllinien aus. Noch deutlicher war diese Beobachtung bei den LTTs zu machen. Bei den Cisplatin-resistenten Linien konnte lediglich bei T24 TT und bei J82 LTT in den hohen Dosen ein Synergismus festgestellt werden. Bei allen anderen LTTs konnte auch nach mehrmaliger Durchführung des Versuchs in der Regel sogar ein antagonistischer Effekt ($CI > 1$), allenfalls ein additiver Effekt ($CI = 1$) gezeigt werden. Somit war diese Kombinationsbehandlung für weitere Analysen nicht interessant.

4.3 Auswahl eines geeigneten epigenetischen Inhibitors für die Kombination mit PARPi

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass der HDACi Romidepsin in UCCs ebenfalls einen Phänotyp induziert, der einer *BRCAness* ähnelt. Aus diesem Grund wurde dieser HDACi als erster epigenetischer Inhibitor für eine Kombination mit Olaparib ausgewählt.

Zunächst wurde erneut mit Hilfe von MTT-Tests der Romidepsin IC_{50} für die parentalen und die Cisplatin-resistenten UCCs bestimmt. Beispielhaft wurde hier zunächst mit den Zelllinien RT-112 und T24 und ihren jeweiligen LTT-Partnern gearbeitet. Alle vier Zelllinien wurden mit Dosierungen zwischen 1 nM und 5 nM behandelt. Besonders sensitiv zeigte sich die Zelllinie T24 LTT mit einem IC_{50} von 0,7 nM. RT-112 hatte den höchsten IC_{50} von 2,5 nM. Beide Cisplatin-resistenten Sublinien zeigten sich sensitiver gegenüber der Einzelbehandlung mit Romidepsin mit folgenden Werten: RT-112 LTT $IC_{50} = 2,0$ nM, T24 LTT $IC_{50} = 0,7$ nM (Abb. 6).

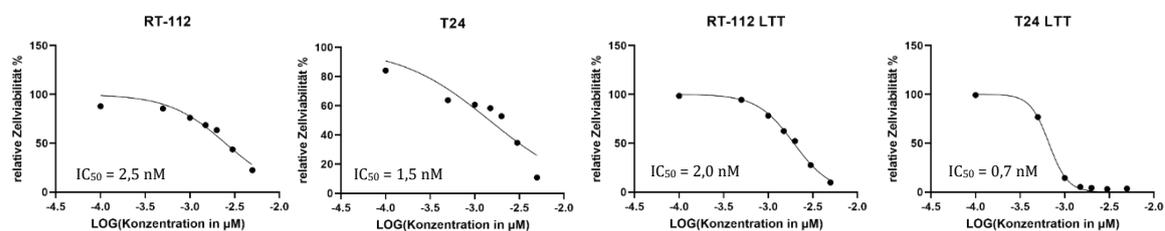


Abb. 6: Dosiswirkungskurven nach Behandlung der UC-Zelllinien RT-112 und T24, sowie ihre LTT-Zelllinien mit Romidepsin. Dargestellt ist die logarithmierte Konzentration des HDACi Romidepsin auf der x-Achse und die jeweilige relative Zellviabilität auf der y-Achse. Die Graphen zeigen die Zellviabilität in Abhängigkeit zur Romidepsin-Konzentration der Cisplatin-sensitiven- und resistenten UC-Zelllinien, sowie die jeweiligen Zelllinien-spezifischen IC_{50} -Werte.

Alle vier Zelllinien wurden anschließend mit der Kombination aus Romidepsin und Olaparib behandelt und 72 Stunden inkubiert. Das Behandlungsschema entsprach den bereits zuvor dargestellten Abstufungen von $0 \times IC_{50}$ bis $1,5 \times IC_{50}$ für beide Substanzen mit den jeweiligen Zelllinien-spezifischen IC_{50} -Werten (Schema siehe Tabelle 33). Wie auch bei der zuvor beschriebenen Kombinationstherapie aus Olaparib und Cisplatin wurden die Daten mit Hilfe eines MTT-Tests ausgewertet und durch die Chou-Talalay Methode ein *Combination-Index Plot* für jede Zelllinie angefertigt. Die daraus entstandenen Diagramme sind in Abb. 7 zu sehen.

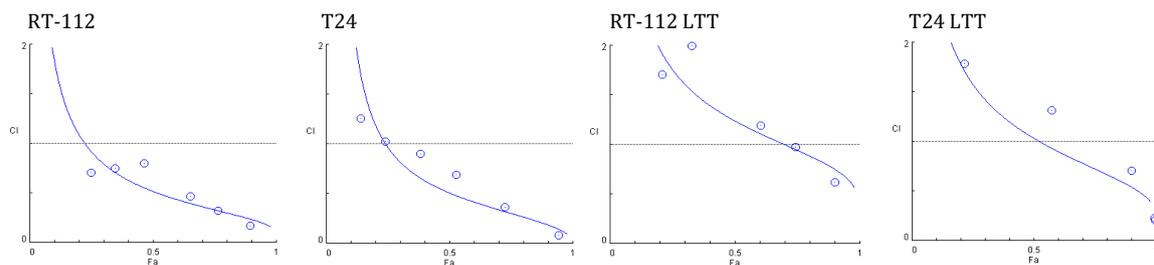


Abb. 7: Chou-Talalay Analyse der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Romidepsin.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Synergieanalyse der Cisplatin-sensiblen UCCs RT-112 und T24, sowie die jeweiligen Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien. Auf der x-Achse ist die *Fraction affected* (1-relative Viabilität = Anzahl der toten Zellen) abgebildet. Auf der y-Achse ist der *Combination Index* (CI) dargestellt. $CI < 1$ zeigt einen Synergismus, $CI = 1$ zeigt einen additiven Effekt, $CI > 1$ zeigt einen antagonistischen Effekt.

Aus den Chou-Talalay Diagrammen war ersichtlich, dass das Ansprechen auf die Kombinationsbehandlung zwischen den parentalen und den Cisplatin-resistenten Zelllinien unterschiedlich war: Während bei den parentalen Zelllinien RT-112 und T24 ein synergistischer Effekt der Kombination von Olaparib und Romidepsin bei nahezu allen Dosispunkten, also auch den niedrigeren Dosierungen zu sehen war ($CI < 1$), so blieb dieser Effekt bei den LTTs weitestgehend aus oder auf hohe Dosen um den IC_{50} -Wert herum beschränkt. Mit Blick auf die Zielsetzung neue therapeutische Optionen für die Behandlung Cisplatin-resistenter UCCs zu finden, die auch möglichst durch Synergie eine Dosisreduktion zur Verminderung der Normaltoxizität erlaubt, erwies sich die Kombination eines PARPi mit dem HDACi Romidepsin nicht als zielführend. Aus diesem Grund wurden in diesem Projekt keine weiteren Untersuchungen mit Romidepsin als Kombinationspartner vorgenommen.

Als zweiter Kombinationspartner wurde der BETi PLX ausgewählt. Mit Hilfe der MTT-Analyse wurde zunächst für alle vier parentalen und alle vier Cisplatin-resistenten Zelllinien der individuelle IC_{50} -Wert für PLX bestimmt. Die Zellen wurden mit Konzentrationen zwischen $0 \mu M$ und $15 \mu M$ behandelt. Bei den parentalen UCCs zeigte sich T24 am sensitivsten gegenüber der Behandlung mit PLX ($IC_{50} = 2,14 \mu M$). Der IC_{50} von RT-112 und 253J lag etwas

darüber mit $3,04 \mu\text{M}$ für RT-112 und $3,19 \mu\text{M}$ für 253J. Ein auffälliges Ergebnis konnte bei der Zelllinie J82 beobachtet werden: Diese zeigte sich gegenüber der Mono-Behandlung mit PLX als weitestgehend resistent. Auch die Behandlung mit $15 \mu\text{M}$ PLX konnte keinen Zelltod bewirken. Ein IC_{50} -Wert konnte somit mit Hilfe der GraphPad-Software nur näherungsweise errechnet werden ($= 30,4 \mu\text{M}$).

Auch die vier LTT-Zelllinien wurden mit dem BETi PLX behandelt und ihre IC_{50} -Werte bestimmt. Alle vier LTT-Sublinien waren sensitiver gegenüber dem BETi als ihre Parentallinien. Ähnlich wie bei den parentalen Zelllinien war auch hier T24 LTT am sensitivsten gegenüber der Behandlung mit einem IC_{50} von $0,8 \mu\text{M}$. RT-112 LTT und 253J LTT hatten den gleichen Wert von $1,3 \mu\text{M}$. Anders als bei der parentalen Zelllinie zeigte J82 LTT sich sensitiv gegenüber der Behandlung mit PLX. Hier konnte ein IC_{50} von $3,1 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Die zugehörigen Graphen sind in Abb. 8 zu sehen. Zum Vergleich lag der IC_{50} -Wert für die benigne Kontrollzelllinie HBLAK in Vorarbeiten bei $0,6 \mu\text{M}$.

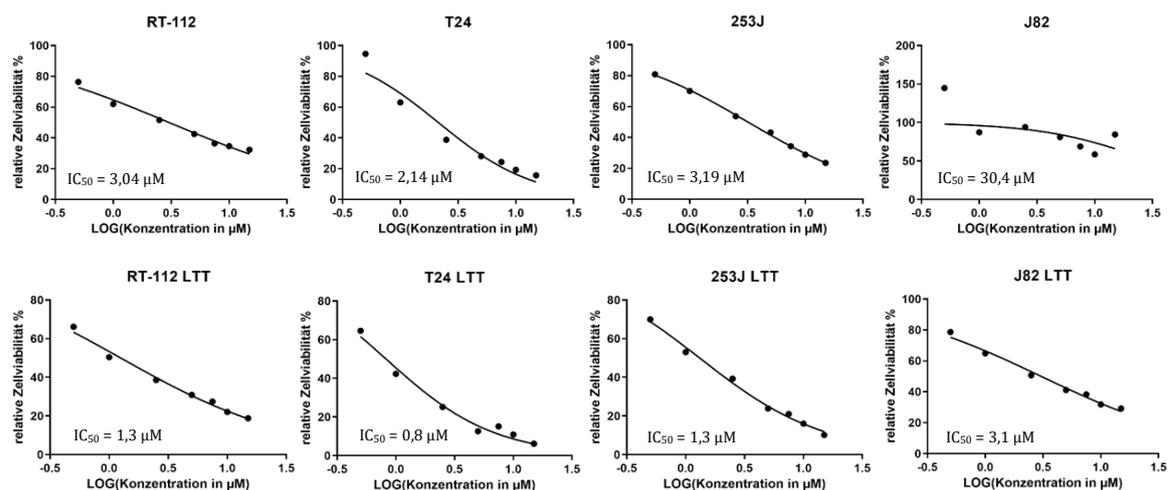


Abb. 8: Dosiswirkungskurven nach Behandlung der parentalen und Cisplatin-resistenten UCCs mit PLX. Dargestellt ist die logarithmierte Konzentration des BETi PLX auf der x-Achse und die jeweilige relative Zellviabilität auf der y-Achse. Die Graphen zeigen die Zellviabilität in Abhängigkeit zur PLX-Konzentration der Cisplatin-sensitiven- und resistenten UC-Zelllinien, sowie die jeweiligen Zelllinien-spezifischen IC_{50} -Werte.

Durch die ermittelten Zelllinien-individuellen IC_{50} -Werte für Olaparib und PLX konnte im nächsten Schritt die Kombinationsbehandlung der beiden Substanzen durchgeführt werden. Die Vorgehensweise gestaltete sich analog der Kombinationsbehandlung mit Olaparib plus Romidepsin. Abb. 9 zeigt die aus den Ergebnissen ermittelten Combination-Index Plots, die mit Hilfe der Chou-Talalay Methode erstellt wurden.

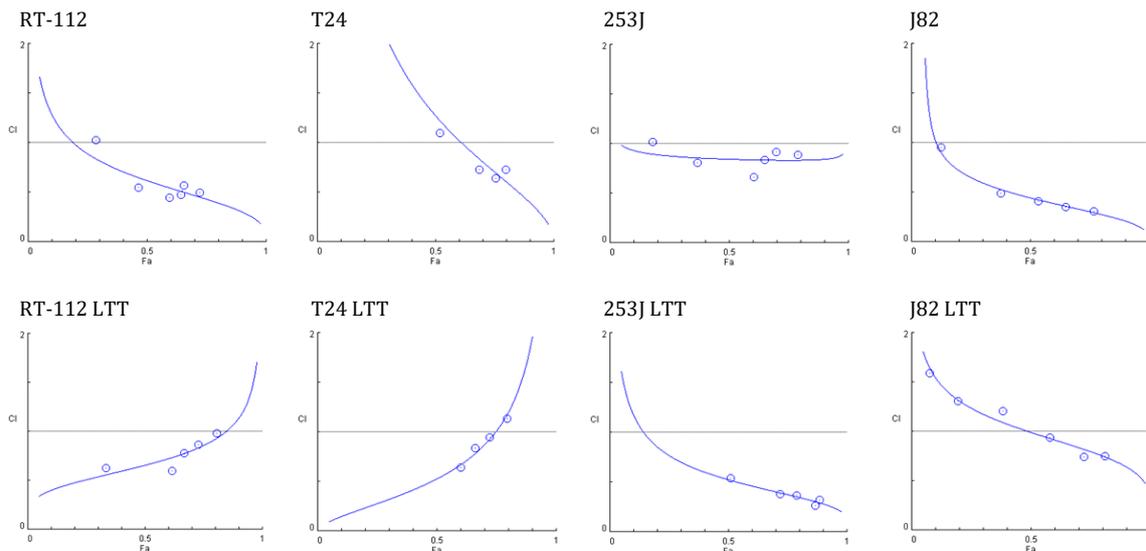


Abb. 9: Chou-Talalay Analyse der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX. Die obere Reihe zeigt die Ergebnisse der Synergieanalyse der Cisplatin-sensiblen UCCs, die untere Reihe zeigt die Ergebnisse der Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien. Auf der x-Achse ist die *Fraction affected* (1-relative Viabilität = Anzahl der toten Zellen) abgebildet. Auf der y-Achse ist der *Combination Index* (CI) dargestellt. $CI < 1$ zeigt einen Synergismus, $CI = 1$ zeigt einen additiven Effekt, $CI > 1$ zeigt einen antagonistischen Effekt.

In allen acht Zelllinien war ein synergistischer Effekt der Kombinationstherapie des PARPi und des BETi zu sehen ($CI < 1$). Anders als bei der Kombination mit Romidepsin zeigte sich hier besonders bei den LTTs eine Synergie, auch in den niedrigeren Dosisbereichen. Darüber hinaus war hervorzuheben, dass auch in der Zelllinie J82, welche sich zuvor als resistent gegenüber dem BETi PLX gezeigt hatte, eine deutliche Synergie der beiden Substanzen zu erkennen war. Dem gegenüber stand die Cisplatin-resistente J82 LTT. Hier war der synergistische Effekt von Olaparib und PLX etwas schwächer ausgeprägt und eher in den höheren Dosisbereichen zu finden.

Die Kombination aus dem PARPi Olaparib und dem BETi PLX hatte also erfolgsversprechende Ergebnisse gezeigt, die in diesem Projekt weiterverfolgt werden sollten. Dabei war insbesondere die synergistische Wirkung dieser Kombination auf die Cisplatin-resistenten Sublinien von Interesse.

4.4 Dosisreduktion durch die synergistische Wirkung des PARPi und des BETi

Um die mögliche Nebentoxizität der Kombinationsbehandlung zu minimieren, die vor allem auf der Zytotoxizität des BETi beruht, sollte im nächsten Schritt die Synergie der beiden Substanzen ausgenutzt und eine Dosisreduktion bei gleichbleibender Wirkung erzielt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine vollständige Matrix für die Zelllinie RT-112 angefertigt. In dieser Matrix wurden die beiden Substanzen nicht mehr nur in

gleichbleibenden IC₅₀-Verhältnissen miteinander kombiniert, sondern unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse auf die Zellen angewandt. Dabei wurde mit sieben Abstufungen zwischen 0 x IC₅₀ (Kontrolle) und 1,5 x IC₅₀ pro Substanz gearbeitet. Tabelle 36 gibt einen Überblick über die verwendeten Konzentrationen.

Tabelle 36: Behandlungsmatrix der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX für RT-112. Dargestellt sind die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse des PAPRi Olaparib in **fett** gedruckter Schrift, sowie des BETi PLX in *kursiver* Schrift. Grundlage der hier dargestellten Konzentrationen sind die jeweiligen IC₅₀-Werte für die Zelllinie RT-112, welche mit den angegebenen Faktoren multipliziert wurden.

Olaparib*	0 x IC₅₀	0,125 x IC₅₀	0,25 x IC₅₀	0,5 x IC₅₀	0,75 x IC₅₀	1,0 x IC₅₀	1,5 x IC₅₀
<i>PLX**</i>							
<i>0 x IC₅₀</i>	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM	0 µM
	<i>0 µM</i>	<i>0,375 µM</i>	<i>0,75 µM</i>	<i>1,5 µM</i>	<i>2,25 µM</i>	<i>3,0 µM</i>	<i>4,5 µM</i>
<i>0,125 x IC₅₀</i>	6,25 µM	6,25 µM	6,25 µM	6,25 µM	6,25 µM	6,25 µM	6,25 µM
	<i>0 µM</i>	<i>0,375 µM</i>	<i>0,75 µM</i>	<i>1,5 µM</i>	<i>2,25 µM</i>	<i>3,0 µM</i>	<i>4,5 µM</i>
<i>0,25 x IC₅₀</i>	12,5 µM	12,5 µM	12,5 µM	12,5 µM	12,5 µM	12,5 µM	12,5 µM
	<i>0 µM</i>	<i>0,375 µM</i>	<i>0,75 µM</i>	<i>1,5 µM</i>	<i>2,25 µM</i>	<i>3,0 µM</i>	<i>4,5 µM</i>
<i>0,5 x IC₅₀</i>	25,0 µM	25,0 µM	25,0 µM	25,0 µM	25,0 µM	25,0 µM	25,0 µM
	<i>0 µM</i>	<i>0,375 µM</i>	<i>0,75 µM</i>	<i>1,5 µM</i>	<i>2,25 µM</i>	<i>3,0 µM</i>	<i>4,5 µM</i>
<i>0,75 x IC₅₀</i>	37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM
	<i>0 µM</i>	<i>0,375 µM</i>	<i>0,75 µM</i>	<i>1,5 µM</i>	<i>2,25 µM</i>	<i>3,0 µM</i>	<i>4,5 µM</i>
<i>1,0 x IC₅₀</i>	50,0 µM	50,0 µM	50,0 µM	50,0 µM	50,0 µM	50,0 µM	50,0 µM
	<i>0 µM</i>	<i>0,375 µM</i>	<i>0,75 µM</i>	<i>1,5 µM</i>	<i>2,25 µM</i>	<i>3,0 µM</i>	<i>4,5 µM</i>
<i>1,5 x IC₅₀</i>	75,0 µM	75,0 µM	75,0 µM	75,0 µM	75,0 µM	75,0 µM	75,0 µM
	<i>0 µM</i>	<i>0,375 µM</i>	<i>0,75 µM</i>	<i>1,5 µM</i>	<i>2,25 µM</i>	<i>3,0 µM</i>	<i>4,5 µM</i>

* IC₅₀ Olaparib für RT-112 = 50 µM

** IC₅₀ PLX für RT-112 = 3,0 µM

Die in Abb. 10 dargestellten Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen zeigten, dass der zusätzliche Effekt der Kombinationstherapie auf die Zellviabilität vor allem in den niedrigeren PLX-Dosierungen zu erkennen war. Bereits bei einer PLX-Dosierung, die nur 0,125 x IC₅₀ betrug, konnte in Kombination mit 0,75 x IC₅₀ Olaparib eine relative Viabilität von weniger als 50% erzielt werden (relative Viabilität = 0,49). Um eine robuste Reduktion der Viabilität zu bewirken, wurde für den weiteren Verlauf des Projekts eine feste Dosisreduktion von 0,75 x IC₅₀ Olaparib in Kombination mit 0,25 x IC₅₀ PLX (relative Viabilität = 0,43) festgesetzt (siehe Pfeilmarkierung in Abb. 10).

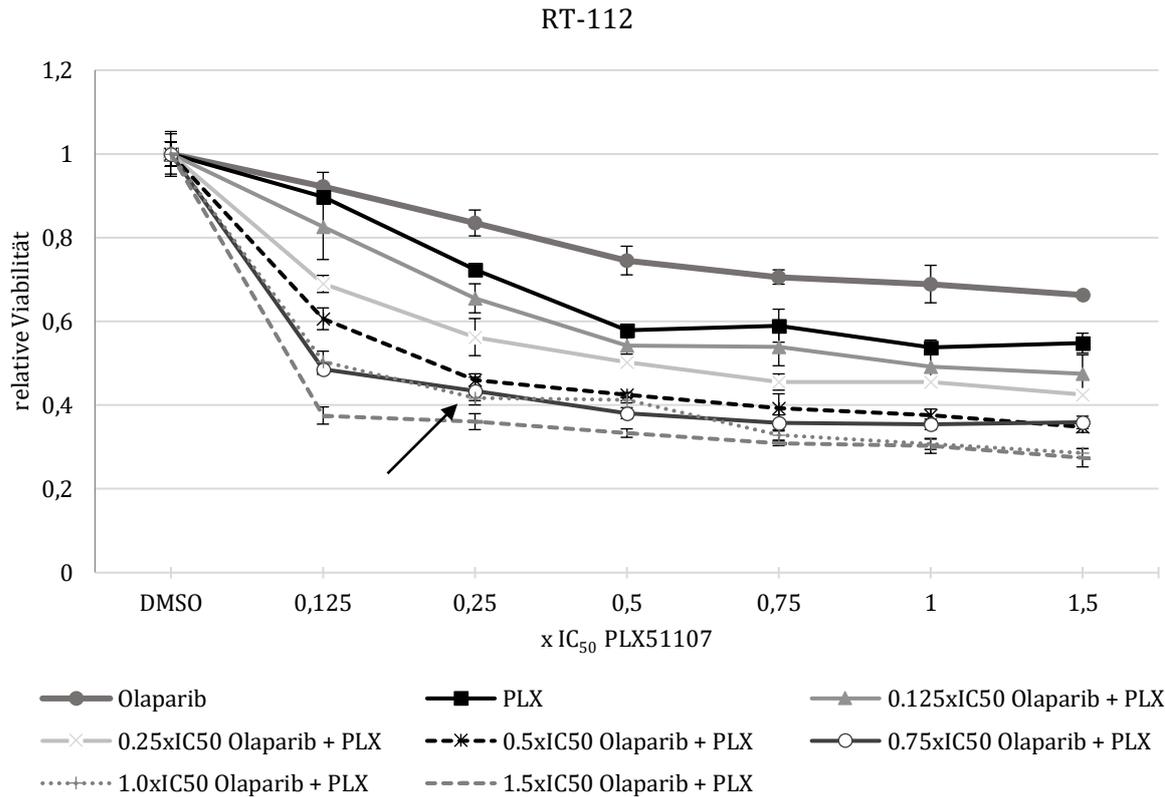


Abb. 10: Dosiswirkungskurve der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie RT-112. Dargestellt ist der Multiplikationsfaktor des IC₅₀-Wertes der jeweiligen Substanz auf der x-Achse, sowie die relative Viabilität zur DMSO-Kontrolle auf der y-Achse. Der Pfeil markiert die feste Dosisreduktion beider Substanzen, die im weiteren Verlauf des Projektes in der Kombinationsbehandlung angewandt wurde (relative Viabilität = 0,43).

Auf Basis der Ergebnisse, die bei der Zelllinie RT-112 beobachtet werden konnten, wurde eine weitere „kleine Matrix“ mit der Zelllinie T24 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass auch hier die zuvor festgelegte Dosisreduktion einen sehr guten synergistischen Effekt auf die Zellviabilität hatte. Bei einer Dosierung von 0,75 x IC₅₀ Olaparib in Kombination mit 0,25 x IC₅₀ PLX betrug die relative Zellviabilität nur noch 0,33 (siehe Pfeilmarkierung in Abb. 11).

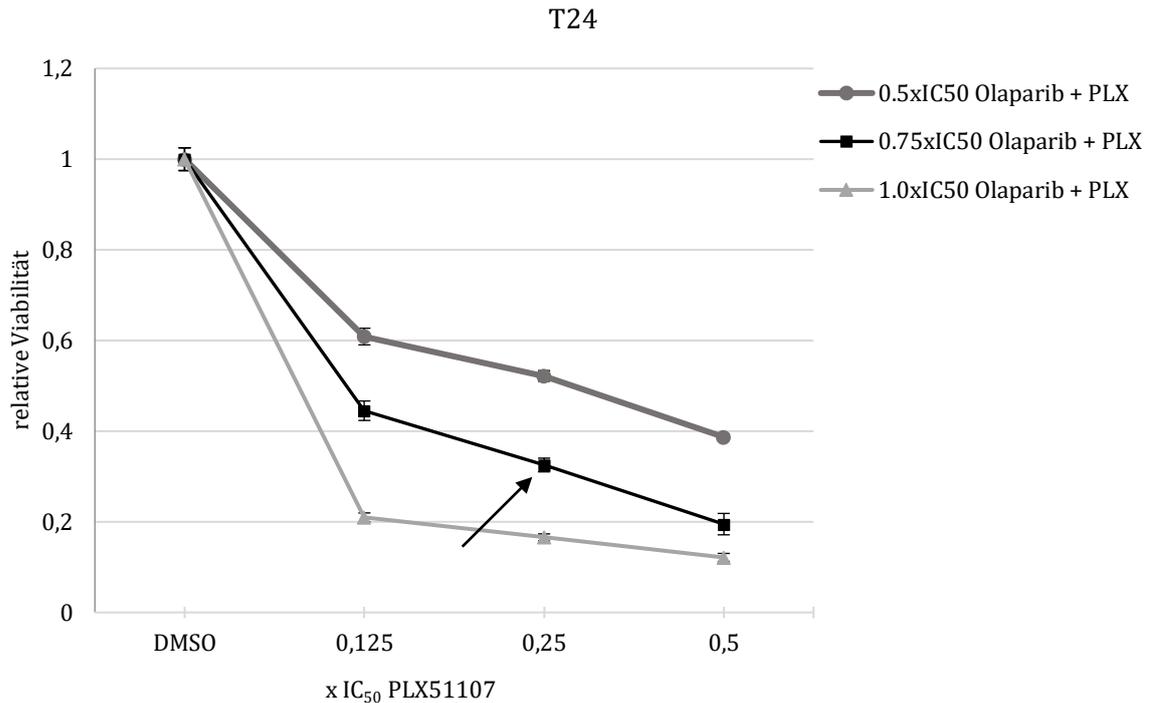


Abb. 11: Dosiswirkungskurve der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie T24. Dargestellt ist der Multiplikationsfaktor des IC₅₀-Wertes der jeweiligen Substanz auf der x-Achse, sowie die relative Viabilität zur DMSO-Kontrolle auf der y-Achse. Der Pfeil markiert die feste Dosisreduktion beider Substanzen, die im weiteren Verlauf des Projektes in der Kombinationsbehandlung angewandt wurde (relative Viabilität = 0,33).

Da im Rahmen dieses Projektes ein Behandlungsansatz entwickelt werden sollte, auf den auch die Cisplatin-resistenten Sublinien gut ansprechen, wurde auch für die LTTs untersucht, ob durch die Kombination eine Dosisreduktion der einzelnen Substanzen erzielt werden konnte bei gleichbleibendem oder sogar zusätzlichem Effekt auf die Zellviabilität. Genau wie bei der parentalen Zelllinie RT-112 wurde daher eine vollständige Matrix für die Zelllinien RT-112 LTT und T24 LTT angefertigt. Die daraus resultierenden Graphen sind in Abb. 12 zu sehen.

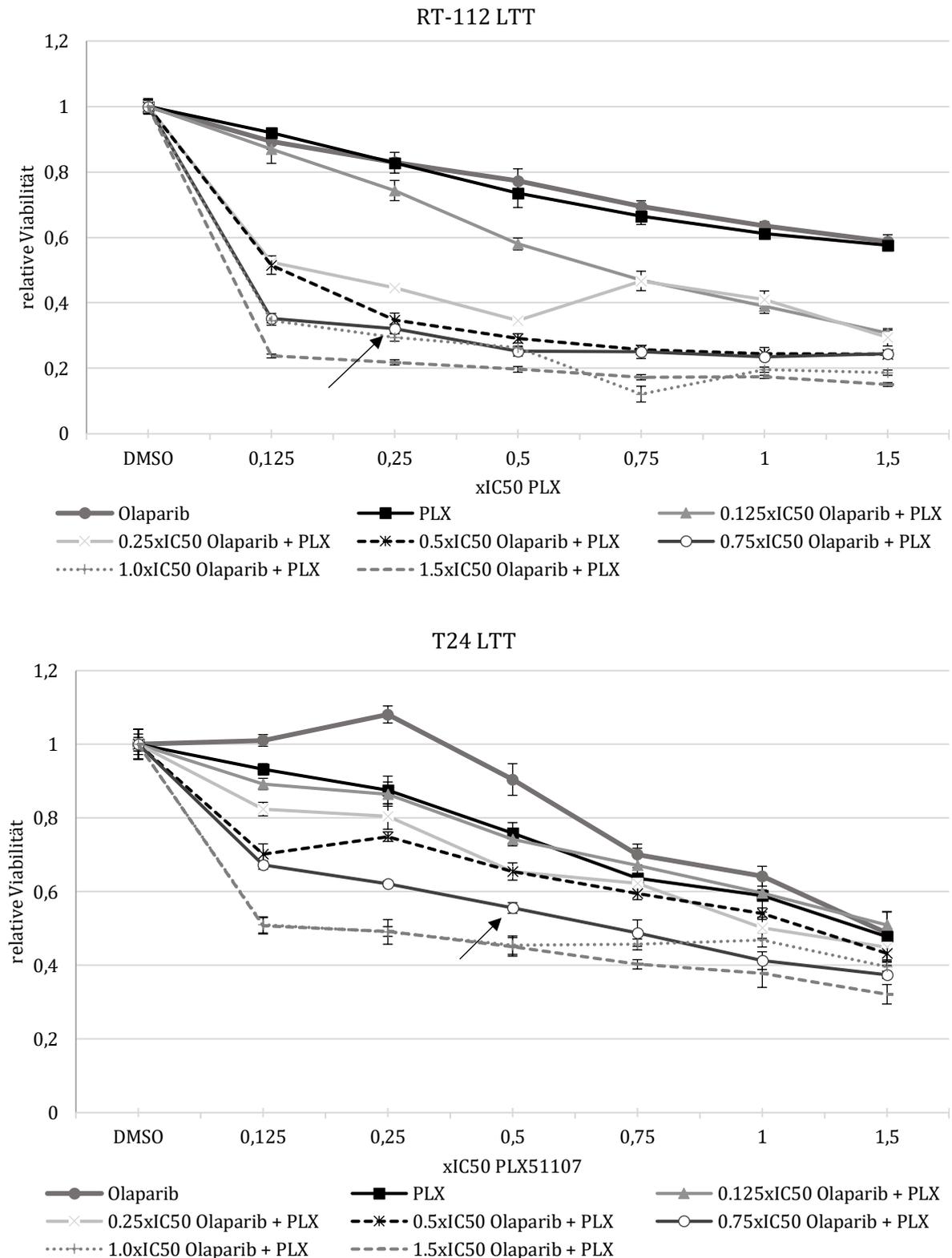


Abb. 12: Dosiswirkungskurve der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinien RT-112 LTT und T24 LTT. Dargestellt ist der Multiplikationsfaktor des IC₅₀-Wertes der jeweiligen Substanz auf der x-Achse, sowie die relative Viabilität zur DMSO-Kontrolle auf der y-Achse. Der Pfeil markiert die feste Dosisreduktion beider Substanzen, die im weiteren Verlauf des Projektes in der Kombinationsbehandlung angewandt wurde (relative Viabilität für RT-112 LTT = 0,32, für T24 LTT = 0,55).

Die dargestellten Pfeile weisen auf die Werte, die für die nachfolenden Versuche verwendet wurden: Für RT-112 LTT erfolgte die weitere Behandlung mit $0,75 \times IC_{50}$ Olaparib plus $0,25 \times IC_{50}$ PLX (relative Viabilität = 0,32). Bei T24 LTT entschieden wir uns ebenfalls für eine Dosisreduktion von $0,75 \times IC_{50}$ Olaparib, allerdings für eine etwas höhere Dosierung von PLX von $0,5 \times IC_{50}$. Grund dafür war das etwas schlechtere Ansprechen der Zelllinie auf die Kombinationsbehandlung. Während die anderen getesteten Zellreihen bei diesen niedrigen Dosierungen bereits eine Viabilität von unter 50% zeigten, konnte bei T24 LTT nur eine Viabilitätsreduktion von 38% verzeichnet werden. Mit der Kombination $0,75 \times IC_{50}$ Olaparib plus $0,5 \times IC_{50}$ PLX gelang eine Reduktion von 45%.

Tabelle 37 fasst die für die Matrix verwendeten IC_{50} -Werte der vier Zelllinien RT-112, T24, RT-112 LTT und T24 LTT für Olaparib und PLX noch einmal zusammen und gibt einen Überblick über die durch die Kombinationsbehandlung erreichten Dosisreduzierungen. Diese wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, für die nachfolgenden Untersuchungen zugrunde gelegt.

Tabelle 37: Überblick über die durch die Kombinationsbehandlung erreichten Dosisreduzierungen für Olaparib und PLX. Dargestellt sind die zugrunde liegenden IC_{50} -Werte für Olaparib und PLX für die einzelnen Zelllinien, sowie die jeweiligen Multiplikationsfaktoren, die im weiteren Verlauf verwendet wurden zur Dosisreduzierung der beiden Substanzen bei der Kombinationsbehandlung.

	RT-112	T24	RT-112 LTT	T24 LTT
Olaparib IC_{50} (μM)	50.0	18.0	50.0	7.5
Olaparib in Kombination (μM)	37.5	13.5	37.5	5.6
PLX51107 IC_{50} (μM)	3.0	2.0	1.3	1.3
PLX51107 in Kombination (μM)	0.75	0.5	0.3	0.65

4.5 Einfluss der Behandlungen auf die Langzeitproliferationsfähigkeit

Der Effekt der Kombinationsbehandlung Olaparib plus PLX auf die Langzeitproliferationsfähigkeit der Zellen wurde mittels Klonogenitäts-Assays untersucht. Die angefärbten Kolonien sind in Abb. 13 zu sehen.

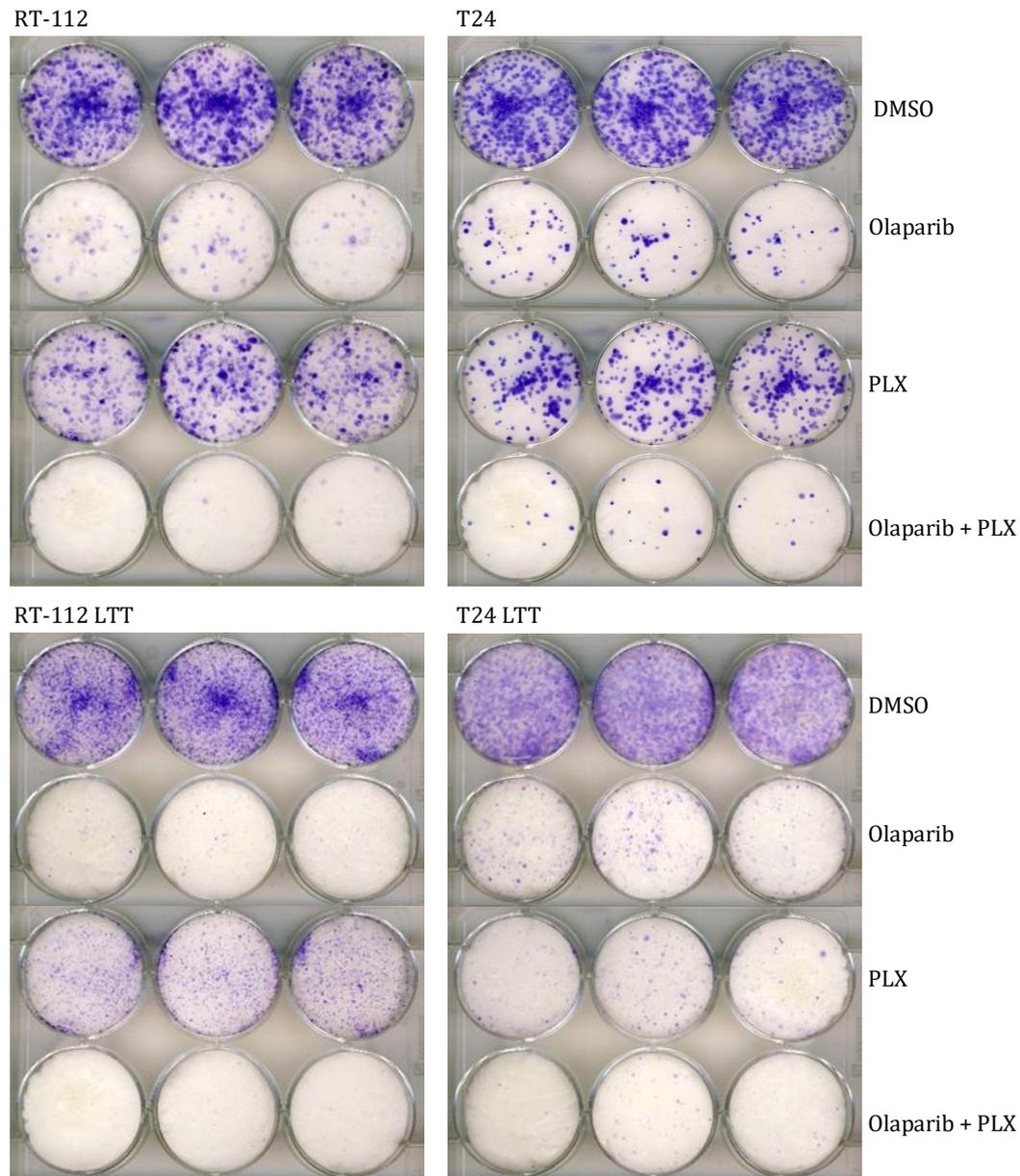


Abb. 13: Klonogenitäts-Assay zur Darstellung der Langzeitproliferationsfähigkeit der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinien RT-112 und T24 und ihr LTT-Sublinien. Zu sehen sind die eingefärbten Kolonien der einzelnen Zelllinien nach der Behandlung mit DMSO (Kontrolle), sowie nach der Einzelbehandlung mit Olaparib und PLX, sowie nach der Kombinationsbehandlung (jeweils drei Wells pro Zelllinie und Substanz).

In der oben dargestellten Klonogenitätsfärbung zeigte sich, dass die Färbung zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurde, an dem die jeweilige DMSO-Kontrollproben annähernd konfluent waren. In der Kontrolle war die Proliferationsfähigkeit der Zellen nicht eingeschränkt. Dem gegenüber standen die Mono- und die Kombinationsbehandlungen mit Olaparib und PLX. Auffällig war, dass die Behandlung mit $0,25 \times IC_{50}$ PLX als Monotherapie in den Zelllinien RT-112, T24 und RT-112 LTT nur einen sehr geringen Einfluss auf die langfristige Proliferationsfähigkeit hatte. Da durch die starke Dosisreduktion die Toxizität der

Einzelbehandlung reduziert werden sollte, war diese Beobachtung durchaus positiv zu werten. Lediglich bei T24 LTT konnte die Proliferation effektiv eingeschränkt werden. Die Behandlung mit $0,75 \times IC_{50}$ Olaparib zeigte in allen behandelten Zelllinien einen stärkeren Effekt als die Monotherapie mit PLX. Auffällig war, dass Olaparib in allen vier Zelllinien trotz der verringerten IC_{50} -Dosierungen einen sehr starken Effekt auf die Langzeitproliferation hatte. In der zuvor durchgeführten Analyse der Kurzzeitproliferation hatten alle vier Zelllinien eine eher schlechte Sensibilität gegenüber der Monotherapie mit Olaparib gezeigt, so dass dieses Ergebnis des Klonogenitäts-Assays nicht zu erwarten war. Dennoch wurde in allen vier Zelllinien deutlich, dass die Kombination aus Olaparib und PLX die stärkste Auswirkung auf die Langzeitproliferation der Zellen hatte.

4.6 Einfluss der Behandlungen auf den Zellzyklus

Mithilfe der Durchflusszytometrie sollte im nächsten Schritt untersucht werden, welchen Einfluss die Einzelbehandlungen durch Olaparib und PLX, sowie die Kombination der beiden Substanzen auf den Zellzyklus haben. Dafür wurden die Zelllinien RT-112 und T24, sowie ihre Cisplatin-resistenten Sublinien mit ihren individuellen reduzierten Konzentrationen (siehe Tabelle 37) mit Olaparib und PLX behandelt und für 72 Stunden inkubiert.

Abb. 14 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Hier ist zu sehen, dass sich in allen vier getesteten Zelllinien bei der DMSO-Kontrolle die meisten Zellen (54% - 68%) in der G1-Phase des Zellzyklus befanden. Lediglich 21% - 32% der Kontrollzellen waren zum Zeitpunkt der Messung in der G2/M-Phase zu finden. Es fiel auf, dass die mit PLX behandelten Zellen ein ähnliches Profil aufwiesen, wie die DMSO-Kontrollzellen. Die Monotherapie mit PLX führte in keiner der vier Zelllinien zu einer relevanten Verschiebung in den Zellzyklusphasen. Dem gegenüber stand die Monotherapie mit Olaparib. Hier war eine Akkumulation in der G2/M-Phase zu beobachten. Die stärkste Verschiebung war in der Zelllinie RT-112 LTT zu sehen: Während in der DMSO-Kontrolle 32% der Zellen in der G2/M-Phase waren, konnte man nach der Behandlung mit Olaparib 75,4% in der G2/M-Phase messen. Einen etwas schwächeren, aber dennoch deutlichen Effekt der Einzelbehandlung mit Olaparib konnte man in der parentalen RT-112 Zelllinie sehen, die in der DMSO-Probe einen Anteil von 25,1% in der G2/M-Phase hatte, in der Olaparib-behandelten 55,7%. Auch T24 und T24 LTT zeigten eine entsprechende Verschiebung in die G2/M-Phase von 21,3% zu 38% (T24) und 26,4% zu 43,3% (T24 LTT). Bei allen vier Zelllinien war nach der Behandlung mit Olaparib ein sehr unregelmäßiges gezacktes Profil der G2/M-Phase zu beobachten. Des Weiteren war zu sehen, dass die Kombination von Olaparib mit PLX im Zellzyklusprofil keine relevante Änderung zur Einzelbehandlung mit Olaparib zeigte. Die prozentualen Verschiebungen von der G1- in die G2/M-Phase, sowie das unregelmäßige Profil der G2/M-Phase blieben in allen vier Zelllinien weitestgehend gleich. Zur besseren

Veranschaulichung der Ergebnisse sind die prozentualen Anteile der Phasen vor und nach der Behandlung in Abb. 15 in Form von Balkendiagrammen aufgetragen.

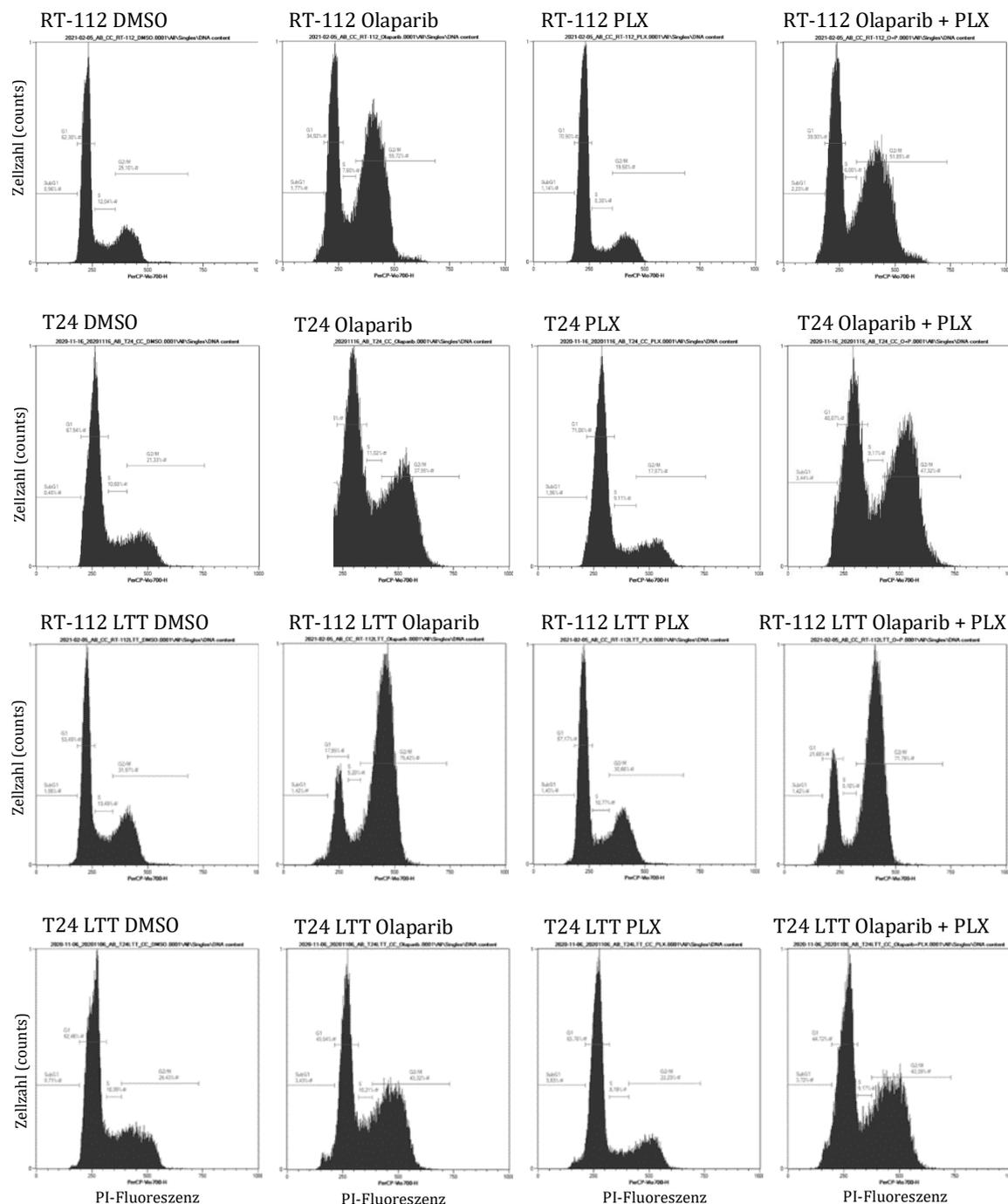


Abb. 14: Histogramme zur Darstellung der Auswirkung der Mono- und Kombinationsbehandlungen mit Olaparib und PLX auf den Zellzyklus. Die beiden Zelllinien RT-112 und T24, sowie ihre jeweiligen LTTs wurden jeweils nach DMSO-Behandlung gemessen (Kontrolle), sowie nach der Einzelbehandlung mit Olaparib und PLX und nach der Kombinationsbehandlung. Dargestellt ist die *Propidium iodide* (PI)-Fluoreszenz auf der x-Achse und die Zellzahl innerhalb der jeweiligen Phase des Zellzyklus auf der y-Achse.

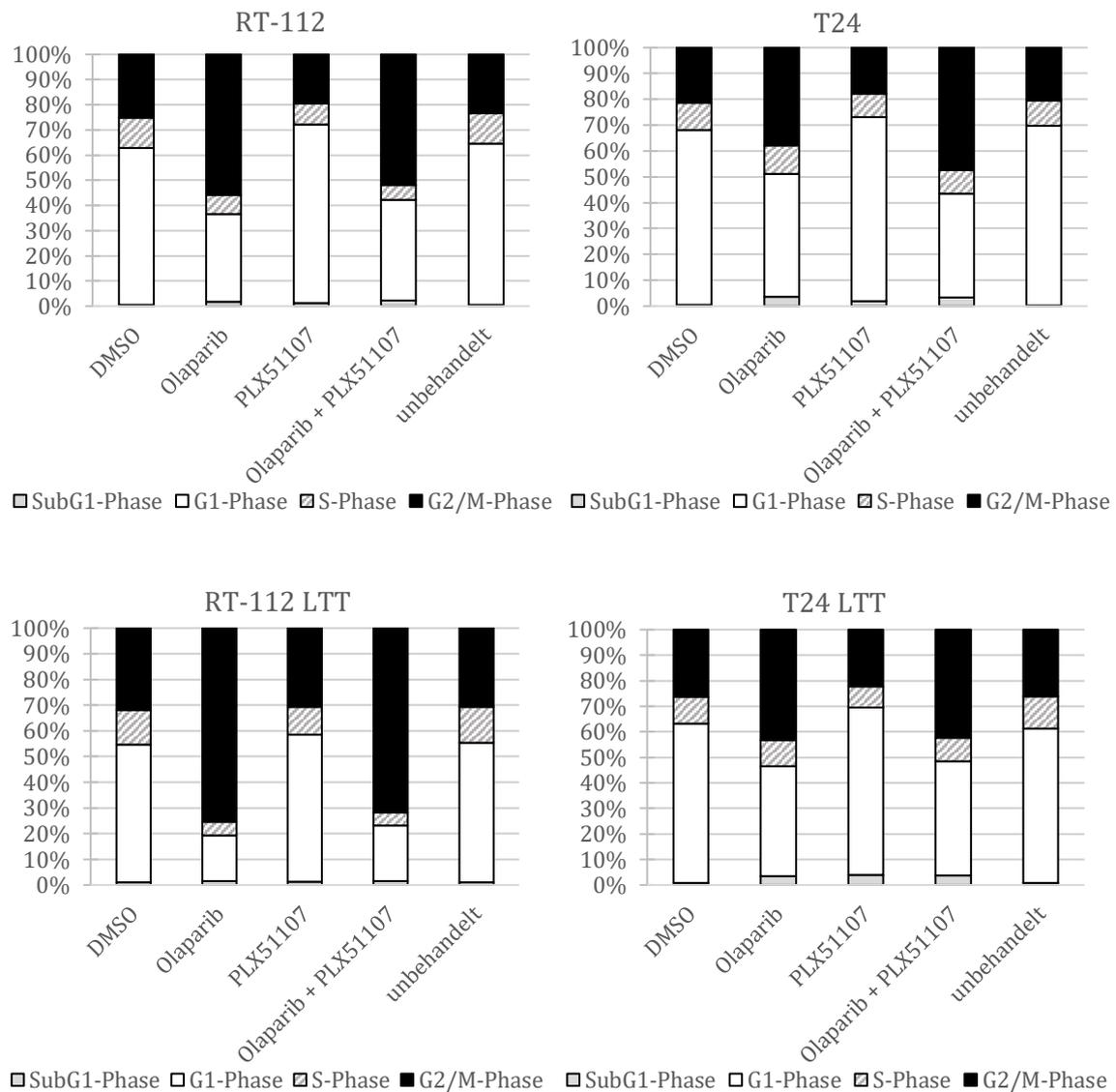


Abb. 15: Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Zellzyklusphase) nach Mono- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib und PLX im Balkendiagramm. Die prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen vor und nach der Behandlung mit den jeweiligen Substanzen sind hier im Balkendiagramm dargestellt und dienen der besseren Veranschaulichung der oben gezeigten Rohdaten der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentendurchgangs.

4.7 Einfluss der Behandlung auf die Apoptose

Neben der Zellzyklusanalyse stellt vor allem die Untersuchung der Apoptoseinduktion eine wichtige Analyse bei der Ermittlung der Zelltodmechanismen dar. Dazu wurden die vier Zelllinien RT-112, T24, RT-112 LTT und T24 LTT im ersten Schritt wiederum 72 Stunden mit den reduzierten Einzeldosierungen für Olaparib und PLX sowie mit der Kombinationstherapie behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde das Ausmaß der

Zelltodinduktion in den Zellen ermittelt. Diese wird in vier mögliche Zustände eingeteilt: lebend/keine Apoptose, frühe Apoptose, späte Apoptose und Nekrose (Abb. 16).

Bei den beiden parentalen Zelllinien waren in der DMSO-Kontrollprobe fast alle Zellen lebend. Die Werte lagen bei 95% (RT-112) und 98% (T24). Ein ähnliches Bild konnte man auch bei beiden Zelllinien nach der alleinigen Behandlung mit PLX feststellen. Hier lagen die Anteile der lebenden Zellen weiterhin bei über 95%. Einen stärkeren Effekt bewirkte die alleinige Behandlung mit Olaparib. Bei der Zelllinie RT-112 konnte durch die Behandlung nur noch eine Viabilität von rund 72% erreicht werden. Einen noch stärkeren Effekt konnte man bei T24 beobachten, die nach der Behandlung mit Olaparib nur noch eine Viabilität von 57% zeigte. In der dargestellten Graphik ist eine deutliche Verschiebung der Punktwolke in Richtung frühe und späte Apoptose sichtbar. Schaut man sich den entsprechenden Graphen der Kombinationsbehandlung Olaparib plus PLX an, so ist zu erkennen, dass bei T24 diese Verschiebung noch deutlicher wurde. Die Zellviabilität sank bei der Kombinationsbehandlung auf unter 30%. Etwas anders verhielt es sich bei der Zelllinie RT-112. Während der Anteil lebender Zellen bei der Einzelbehandlung mit Olaparib bereits bei 72% lag, so konnte dieser Effekt durch die Kombinationsbehandlung nicht verbessert werden.

Noch deutlicher zeigte sich der Erfolg der Kombinationsbehandlung des PARPi Olaparib und des BETi PLX bei den Cisplatin-resistenten Zelllinien RT-112 LTT und T24 LTT (Abb. 16). Da diese Zellen dauerhaft mit Cisplatin behandelt werden, war bereits bei der DMSO-Kontrolle eine etwas geringere Viabilität zu sehen als bei den parentalen Zelllinien (91% bei RT-112 LTT, 88% bei T24 LTT). Durch die alleinige Behandlung mit PLX konnten nur geringe Erfolge erzielt werden. Der Anteil der lebenden Zellen sank bei RT-112 LTT auf 89%, bei T24 LTT auf 78%. Wie auch bei den parentalen Gegenstücken war der Effekt der Monotherapie mit Olaparib besser als mit PLX, die Viabilität konnte durch Olaparib allein auf 82% (RT-112 LTT) und 67% (T24 LTT) gesenkt werden. Umso deutlicher zeigte sich aber der Effekt der Kombinationstherapie: Bei den Cisplatin-resistenten RT-112 LTT waren nur noch rund 66% lebende Zellen messbar, also ein zusätzlicher Erfolg von rund 16 Prozentpunkten gegenüber der Monotherapie mit Olaparib. Vergleich man dieses Resultat mit den Ergebnissen der parentalen Zelllinie RT-112, so wurde der Erfolg bei der LTT-Zelllinie noch deutlicher, da es bei der parentalen Zelllinie bei der Kombinationstherapie keinen zusätzlichen Effekt gegenüber der Einzelbehandlung mit Olaparib gab. Einen ähnlichen Trend konnte man auch bei der zweiten Cisplatin-resistenten Zelllinie T24 LTT beobachten: Bei der Kombinationstherapie waren nur noch 26% lebende Zellen vorhanden, also ein Erfolg von 41 Prozentpunkten gegenüber der Monotherapie mit Olaparib. Die Punktwolke in Abb. 16 verschob sich deutlich in Richtung frühe und späte Apoptose. Auch bei T24 war also der

Effekt zwischen der Einzelbehandlung und der Kombinationsbehandlung deutlicher bei der Cisplatin-resistenten Zelllinie zu beobachten als bei ihrem parentalen Gegenstück.

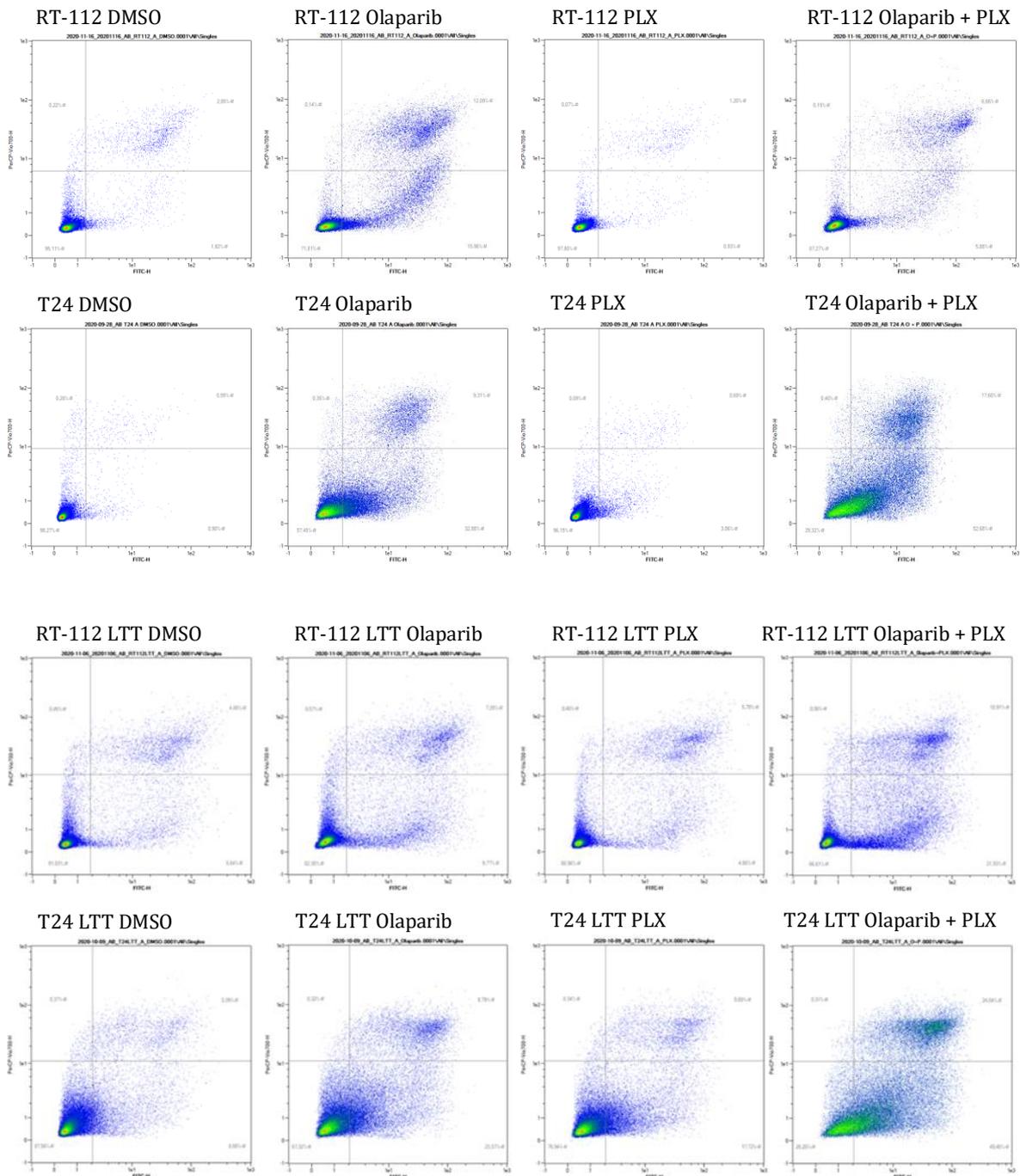


Abb. 16: Dot Plot zur Darstellung der Auswirkung der Mono- und Kombinationsbehandlungen mit Olaparib und PLX auf die Apoptose. Die beiden Zelllinien RT-112 und T24, sowie ihre jeweiligen LTTs wurden jeweils nach DMSO-Behandlung gemessen (Kontrolle), sowie nach der Einzelbehandlung mit Olaparib und PLX und nach der Kombinationsbehandlung. Dargestellt werden vier Zustände: lebend/keine Apoptose (unterer linker Quadrant), frühe Apoptose (unterer rechter Quadrant), späte Apoptose (oberer rechts Quadrant) und Nekrose (oberer linker Quadrant). Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität des FITC-gekoppelten Annexin V dargestellt, auf der y-Achse die des PI.

Das Balkendiagramm in Abb. 17 gibt einen Überblick über die prozentuale Verteilung der Zellviabilität in den vier Zelllinien vor und nach der Behandlung.

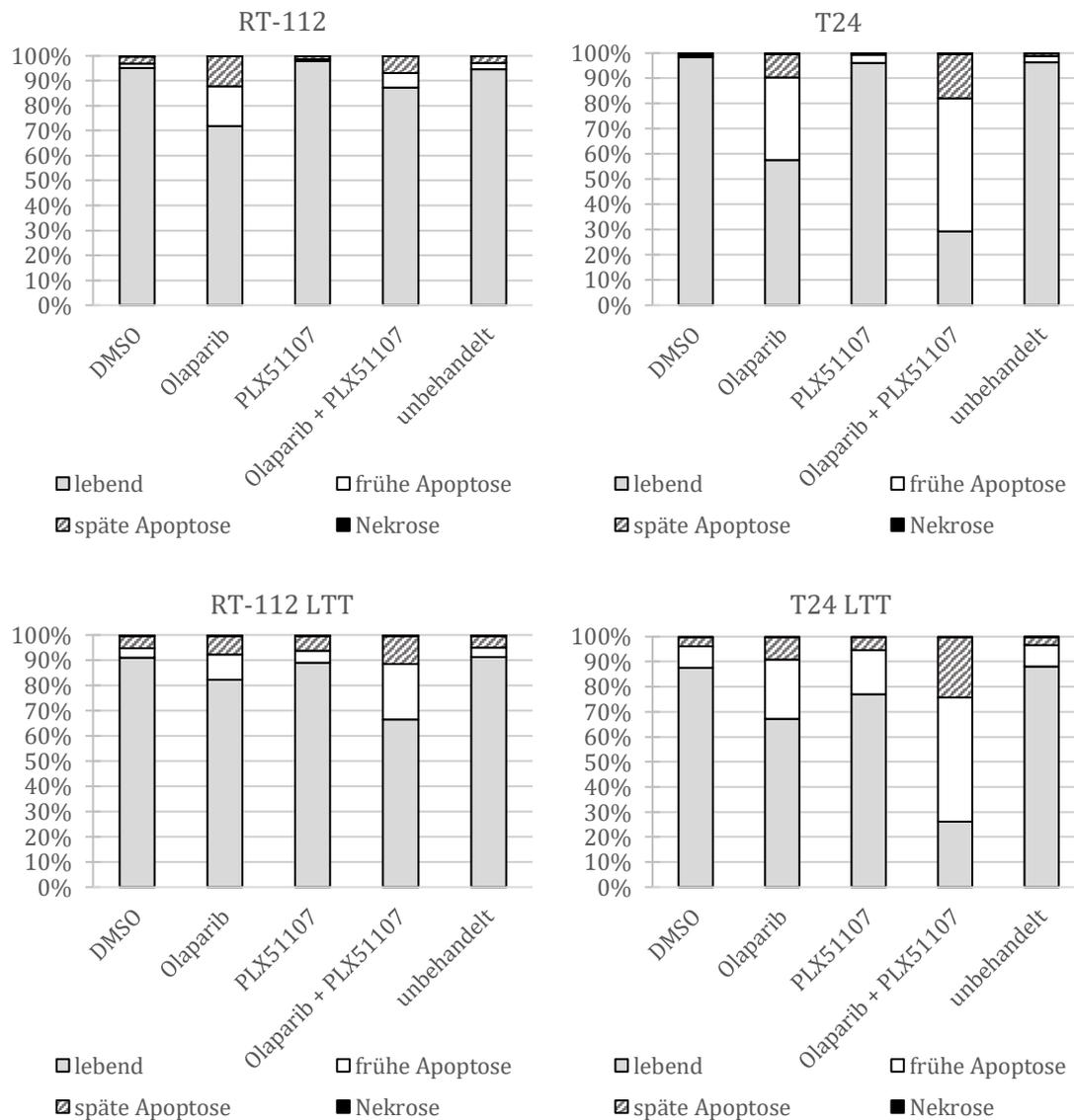


Abb. 17: Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Apoptoseinduktion) nach Mono- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib und PLX im Balkendiagramm. Die prozentualen Anteile des Apoptosezeitpunktes vor und nach der Behandlung mit den jeweiligen Substanzen sind hier im Balkendiagramm dargestellt und dienen der besseren Veranschaulichung der oben gezeigten Rohdaten der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentendurchgangs.

Auch auf Proteinebene konnten die bei der Durchflusszytometrie gefundenen Ergebnisse zur Zelltodinduktion weitestgehend validiert werden (Abb. 18). Dabei wurde die Spaltung des PARP-Proteins als Apoptosemarker verwendet. PARP spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur und wird im Falle eines programmierten Zelltodes in das so genannte *cleaved PARP* (engl. für „gespaltenes PARP“) zerlegt. Eine Zunahme der *cleaved PARP*-Bandenstärke

kann daher als Zeichen der Apoptose interpretiert werden. Alpha-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

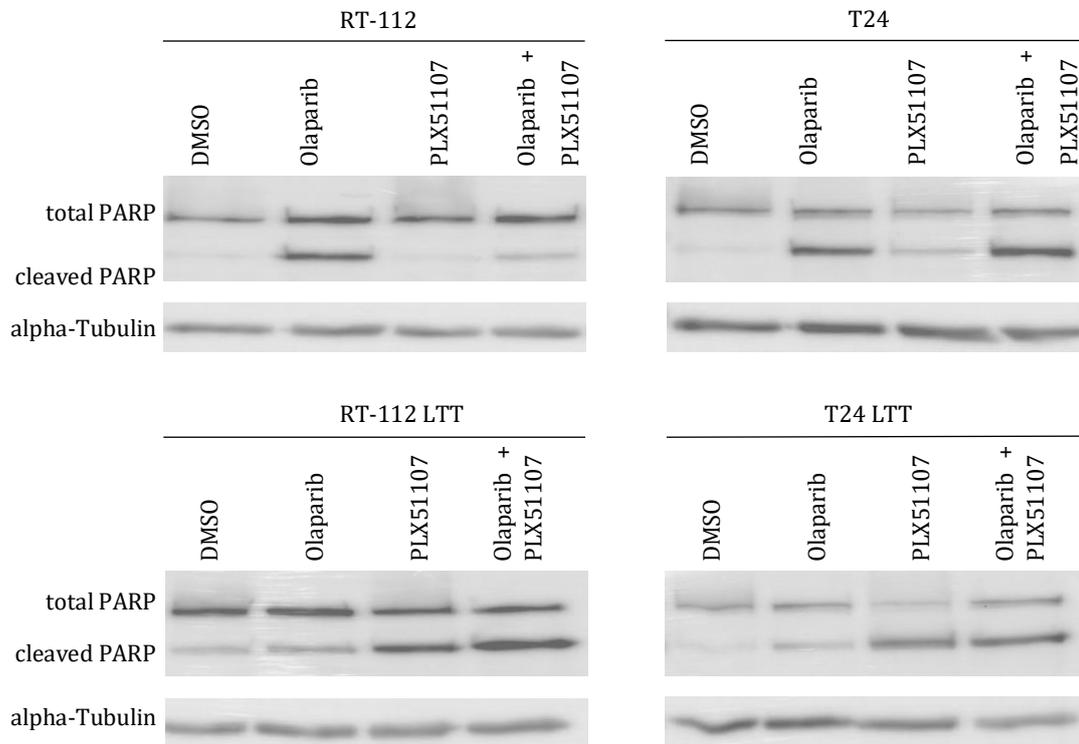


Abb. 18: Western Blot Analyse zur Validierung der Apoptoseinduktion durch die Mono- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib und PLX auf Proteinebene. Darstellung des *total PARP* in der jeweiligen Probe, sowie des *cleaved PARP* als Apoptosemarker in der DMSO-Kontrolle und nach den jeweiligen Einzel- und Kombinationsbehandlungen. Alpha-Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Ergebnisse der parentalen Zelllinien RT-112 und T24 spiegelten die Resultate der zuvor gezeigten Durchflusszytometrie wider. Die DMSO-Kontrolle zeigte in beiden Zelllinien kaum PARP-Spaltung. Auch die mit PLX behandelten Proben hatten nur einen leichten Anstieg des Apoptosemarkers. Die Behandlung mit Olaparib wiederum zeigte in beiden Zelllinien einen deutlichen Anstieg von gespaltenem PARP. Außerdem war bei T24 eine Zunahme der Apoptose durch die Kombinationstherapie von Olaparib plus PLX zu erkennen. Dieser Effekt war bei RT-112, wie auch zuvor bei der Analyse durch die Durchflusszytometrie, nicht zu erkennen. Der Anteil des Apoptosemarkers erschien bei RT-112 bei der Kombinationsbehandlung geringer als bei der Monotherapie mit Olaparib.

Bei den Cisplatin-resistenten LTTs war ebenfalls bei der DMSO-Kontrolle kaum *cleaved PARP* zu erkennen. Generell konnte man auch hier einen etwas höheren Anteil des Apoptosemarkers erkennen im Vergleich zu den parentalen Gegenstücken, vermutlich da

diese Zellen dauerhaft mit Cisplatin behandelt wurden. Abweichend von den Daten der Durchflusszytometrie war bei den LTTs aber ein stärkerer Effekt bei den mit PLX behandelten Zellen feststellbar. Sowohl bei RT-112 LTT als auch bei T24 LTT war der Anstieg des Apoptosemarkers durch die alleinige Olaparib-Therapie wiederum eher schwach ausgeprägt. Allerdings konnte bei beiden LTT-Zelllinien erneut am meisten PARP-Spaltung und somit die stärkste Apoptose-Induktion bei der Kombinationsbehandlung festgestellt werden.

4.8 Nebentoxizität

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse konnten zeigen, dass die Kombination der beiden Substanzen Olaparib und PLX eine synergistische Wirkung auf die Viabilität der UCCs und insbesondere der LTTs hatte. Um im nächsten Schritt Einblicke in den Effekt der Kombinationsbehandlung auf nicht-Karzinomzellen zu erlangen, wurde die benigne Kontrollzelllinie HBLAK verwendet (Hoffmann et al., 2016). Zunächst wurde auch hier der IC_{50} -Wert für den PARPi Olaparib bestimmt und auf $9,5 \mu\text{M}$ festgelegt. Die Kontrollzelllinie zeigte sich damit deutlich sensibler gegenüber der Behandlung als die parentalen und die meisten LTT-Zelllinien. Lediglich die Cisplatin-resistente Linie T24 LTT hatte mit $5 \mu\text{M}$ einen niedrigeren IC_{50} -Wert. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe legten für HBLAK einen IC_{50} -Wert von $0,6 \mu\text{M}$ für die Substanz PLX zugrunde. Da auch dieser Wert niedriger war als bei allen UCCs und LTTs war auch beim BETi von einem sensibleren Ansprechen der Kontrollzelllinie auszugehen.

Auf Basis der zuvor bestimmten IC_{50} -Werte für HBLAK wurden die Zellen im nächsten Schritt, wie bereits zuvor die UCCs, mit aufsteigenden Konzentrationen zwischen $0 \times IC_{50}$ und $1,5 \times IC_{50}$ mit Olaparib und PLX, sowie der Kombination aus beiden Substanzen behandelt, 72 Stunden inkubiert und mittels MTT-Analyse ausgewertet. Das Behandlungsschema ist beispielhaft in Tabelle 33 dargestellt. Abb. 19 zeigt eine entsprechende Dosiswirkungskurve. Hier war zu sehen, dass mit steigenden Konzentrationen in allen drei Therapieformen ein Absinken der Viabilität zu beobachten war. Dabei zeigte die Kombination aus Olaparib und PLX einen leicht stärkeren Effekt als die Monotherapien. So lag die relative Viabilität bei der Behandlung mit $1 \times IC_{50}$ Olaparib bei 0,43 und bei $1 \times IC_{50}$ PLX bei 0,51. Durch die Kombination sank die relative Viabilität auf 0,35. Wie auch bei den Kombinationsbehandlungen der UCCs wurde auch bei der HBLAK-Zelllinie mithilfe der Chou-Talalay Analyse ein *Combination-Index Plot* erstellt, durch den eine Einschätzung des synergistischen Effekts der beiden Substanzen auf die individuelle Zelllinie erfolgen konnte. Der entstandene Graph ist in Abb. 19 zu sehen.

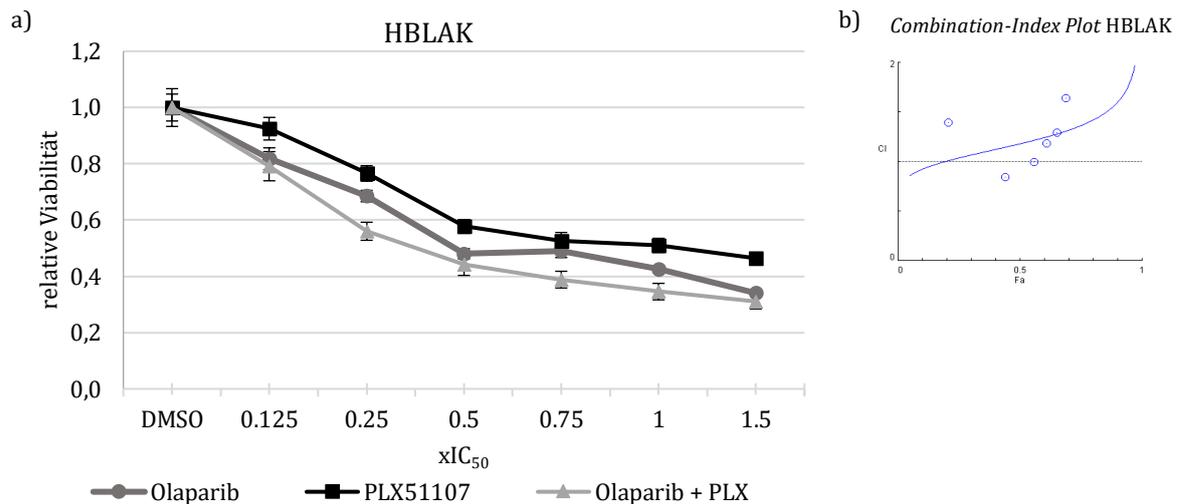


Abb. 19: a) Dosiswirkungskurve der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie HBLAK. Dargestellt ist der Multiplikationsfaktor des IC₅₀-Wertes der jeweiligen Substanz auf der x-Achse, sowie die relative Viabilität zur DMSO-Kontrolle auf der y-Achse. **b) Chou-Talalay Analyse der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin.** Auf der x-Achse ist die *Fraction affected* (1-relative Viabilität = Anzahl der toten Zellen) abgebildet. Auf der y-Achse ist der *Combination Index* (CI) dargestellt. CI < 1 zeigt einen Synergismus, CI = 1 zeigt einen additiven Effekt, CI > 1 zeigt einen antagonistischen Effekt.

Die Synergieanalyse der Kontrollzelllinie ergab, dass die Kombinationsbehandlung von Olaparib und PLX keinen synergistischen Effekt hatte (CI > 1). Konkret bedeutete dies, dass die beiden Substanzen zwar einen Effekt auf die Viabilität der Zellen hatten, dieser aber nicht durch die Kombination synergistisch verstärkt wurde. Dies stand im direkten Gegensatz zu den Ergebnissen der UCCs und der LTTs, bei denen die Kombination aus Olaparib und PLX einen deutlich synergistischen Effekt zeigte, so dass hier ggf. ein therapeutisches Fenster bestehen könnte.

Um einen noch besseren Eindruck der Nebentoxizität zu erhalten, wurden nachfolgend die Kontrollzellen mit den in Tabelle 37 dargestellten reduzierten Konzentrationen für RT-112, T24 und T24 LTT behandelt. Da die IC₅₀-Werte der UCCs und LTTs in den meisten Fällen deutlich über den IC₅₀-Werten von HBLAK lagen, sollte dieser Versuch den Effekt der besonders hohen Konzentrationen der Einzel- und Kombinationsbehandlung auf die Kontrollzelllinien zeigen. Die in Abb. 20 dargestellten Balken zeigen die Behandlung von HBLAK mit den reduzierten Dosierungen von RT-112 (Olaparib = 37,5 µM und PLX = 0,75 µM), T24 (Olaparib = 13,5 µM und PLX = 0,5 µM) und T24 LTT (Olaparib = 5,63 µM und PLX = 0,65 µM).

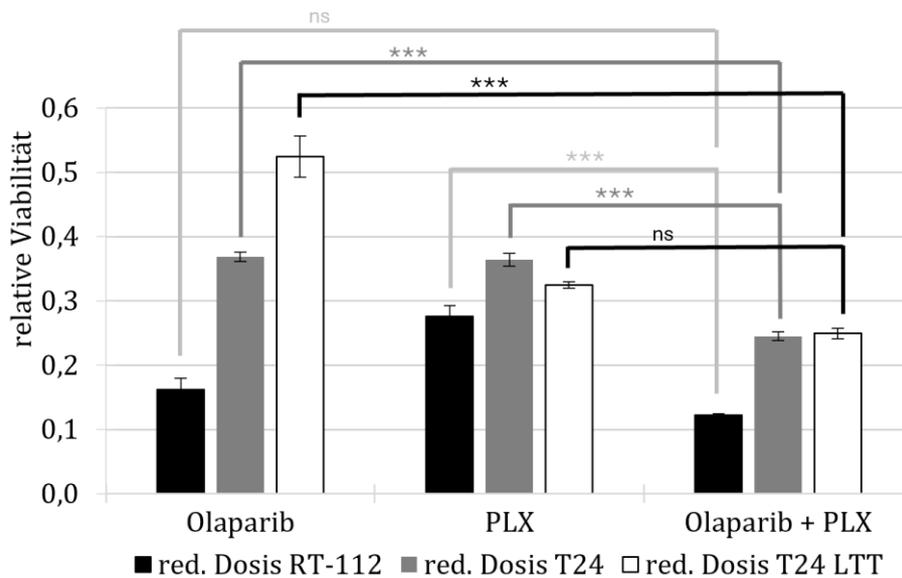


Abb. 20: Balkendiagramm zur MTT-Analyse der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie HBLAK. Dargestellt ist die Behandlung von HBLAK mit den reduzierten Dosierungen der Zelllinien RT-112, T24 und T24 LTT. Auf der x-Achse ist die jeweilige Substanz aufgetragen, auf der y-Achse ist die relative Viabilität zur DMSO-Kontrolle dargestellt. ***= $p \leq 0,001$, ns = nicht signifikant

Wie zu erwarten war sank die Viabilität der HBLAK-Zellen durch die Behandlung in fast allen Fällen unter 50%. Da der IC_{50} von Olaparib für T24 LTT unterhalb des IC_{50} von HBLAK lag, stellte dieser Wert eine Ausnahme dar - die Viabilität blieb knapp oberhalb von 50% bei ca. 53%. Führte man sich vor Augen, dass der IC_{50} für Olaparib für die Zelllinie RT-112 fast viermal höher war als der IC_{50} für HBLAK, so war auch die enorm niedrige Zellviabilität bei der Behandlung von HBLAK mit der Konzentration für RT-112 zu erklären (16% lebende Zellen). Obwohl sich die angewandten reduzierten IC_{50} -Werte für PLX für RT-112, T24 und T24 LTT alle ungefähr im Bereich des IC_{50} -Wertes für HBLAK bewegten (IC_{50} PLX für HBLAK = $0,6 \mu M$), musste bei den hier dargestellten Behandlungen eine starke Abnahme der Zellviabilität unter 50% festgestellt werden. Somit war davon auszugehen, dass PLX schon bei niedrigen Dosiserhöhungen einen steigenden toxischen Effekt auf nicht-Karzinomzellen hatte. Auch die Kombination aus Olaparib und PLX zeigte eine zusätzliche Reduzierung der relativen Zellviabilität von HBLAK.

Wie bei den Karzinomzellen wurde auch für die Kontrollzelllinie HBLAK im nächsten Schritt ein Klonogenitätstest durchgeführt, um den Effekt der Kombinationsbehandlung auf die Langzeitproliferation der Zellen zu untersuchen. Nach der Zellaussaat wurden die Zellen mit den reduzierten IC_{50} Werten für die Zelllinie T24 ($13,5 \mu M$ Olaparib, $0,5 \mu M$ PLX) behandelt. Die gefärbten Zellen sind in Abb. 21 dargestellt. Dort ist zu sehen, dass analog zu den

Ergebnissen des MTT-Tests auch die Langzeitproliferation der HBLAK-Zelllinie durch die Behandlungen stark eingeschränkt wurde. Während in der DMSO-Probe noch deutliche Kolonien sichtbar waren, so waren vor allem bei der Monobehandlung mit PLX und bei der Kombinationsbehandlung aus PLX und Olaparib kaum sichtbare Kolonien darstellbar. Lediglich bei der Einzelbehandlung mit Olaparib waren noch einzelne Kolonien angefärbt.

HBLAK (Behandlung mit reduzierter Dosiskombinationen von T24)



Abb. 21: Klonogenitäts-Assay zur Darstellung der Langzeitproliferationsfähigkeit nach Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie HBLAK. Zu sehen sind die eingefärbten Kolonien der HBLAK-Zelllinie nach der Behandlung mit DMSO (Kontrolle), sowie nach der Einzelbehandlung mit Olaparib und PLX und nach der Kombinationsbehandlung (jeweils drei Wells pro Zelllinie und Substanz). Verwendet wurde die reduzierte Dosierung der Substanzen von T24 (13,5 μM Olaparib, 0,5 μM PLX).

Da bekannt war, dass die Kontrollzelllinie HBLAK aufgrund ihres speziellen Wachstumsmusters im Gegensatz zu den UCCs nur schwer anfärbbar war, wurden zusätzlich zu den Färbungen mikroskopische Bilder von den Kolonien aufgenommen. Diese sind in Abb. 22 zu sehen. Die Fotos machten deutlich, dass die Zellzahl in der DMSO-Kontrolle zwar wesentlich höher war, als bei den behandelten Zellen, dennoch wurde auch klar ersichtlich, dass in den Wells auch nach der Behandlung noch Zellkolonien vorhanden waren. Während bei der klassischen Klonogenitätsfärbung in den Wells mit der PLX-Monotherapie und der Kombinationsbehandlung kaum Zellkolonien zu sehen waren, so waren in den Mikroskopaufnahmen noch deutlich vitale Kolonien zu erkennen, so dass die Darstellung der Färbungen die Toxizität der Behandlung teilweise stärker erscheinen lassen als sie sind (Abb. 22 c und d).

HBLAK (Behandlung mit reduzierter Dosiskombinationen von T24)

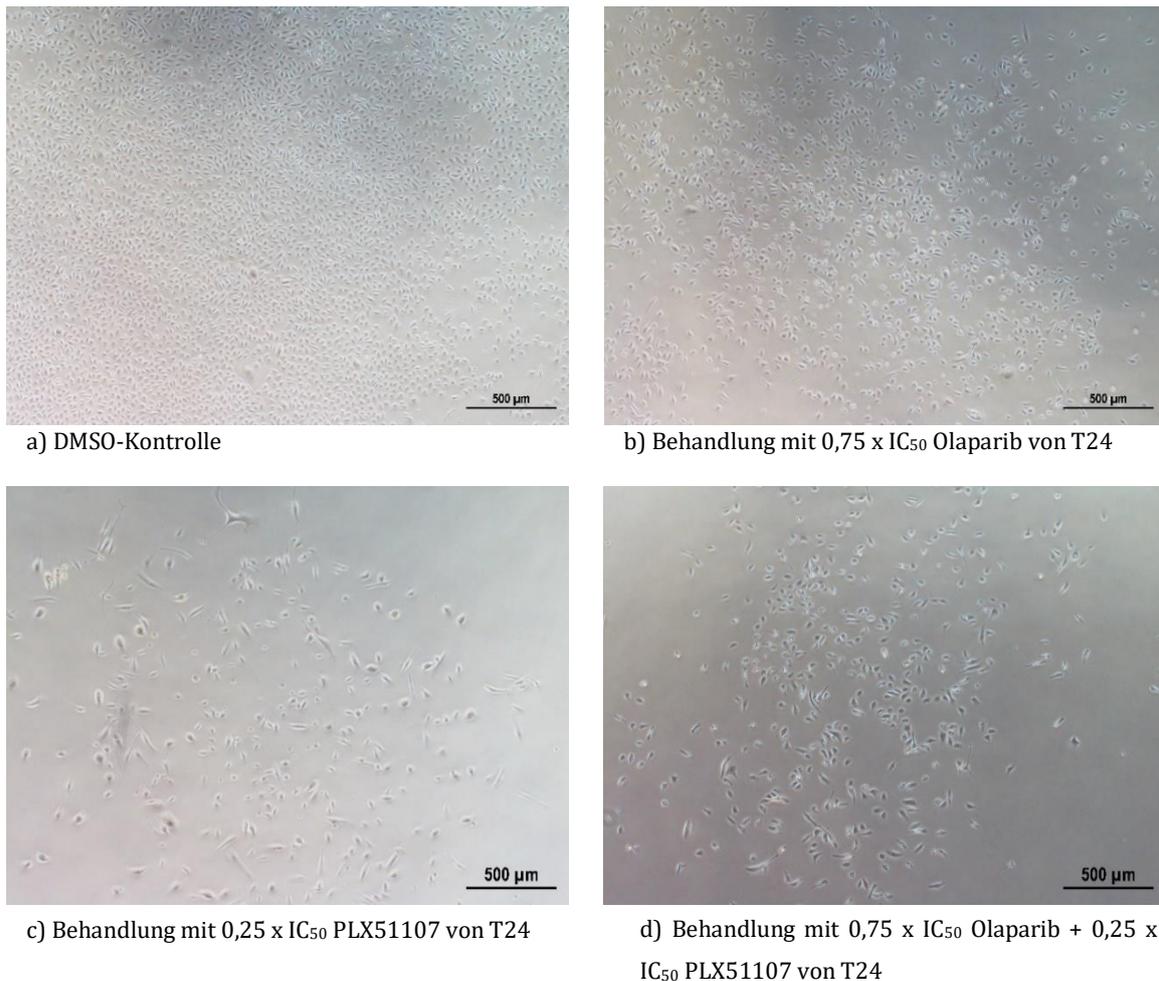


Abb. 22: Mikroskop-Aufnahmen der HBLAK-Kolonien nach Durchführung des Klonogenitäts-Assays nach Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie HBLAK. Zu sehen sind die eingefärbten Kolonien der HBLAK-Zelllinie nach der Behandlung mit DMSO (Kontrolle), sowie nach der Einzelbehandlung mit Olaparib und PLX und nach der Kombinationsbehandlung. Verwendet wurde die reduzierte Dosierung der Substanzen von T24 (13,5 µM Olaparib, 0,5 µM PLX). Maßstab: 500µm, Vergrößerung: 10x Objektiv.

4.9 Validierung der Wirksamkeit der Kombinationstherapie mit dem alternativen PARPi Talazoparib

Die zuvor dargestellten Ergebnisse konnten zeigen, dass eine Kombinationsbehandlung aus einem PARPi mit einem epigenetischen Inhibitor einen synergistischen Therapieeffekt auf Cisplatin-sensitive und -resistente UCCs haben kann. Um die Wirksamkeit der Substanzgruppe PARPi zu validieren, wurde nachfolgend die Kombination des BETi PLX mit einem alternativen PARPi durchgeführt. Dazu wurde die Substanz Talazoparib verwendet. So wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal der direkte Vergleich der Wirksamkeit zweier verschiedener PARPi auf Cisplatin-resistente und -sensitive

Zelllinienpaare untersucht. Wie auch bei dem zuvor verwendeten PARPi Olaparib wurde zunächst der IC_{50} -Wert für Talazoparib für jede individuelle Zelllinie bestimmt – sowohl für die vier parentalen als auch für die vier Cisplatin-resistenten Zelllinien. Dabei konnten die in Abb. 23 dargestellten Graphen und IC_{50} -Werte bestimmt werden.

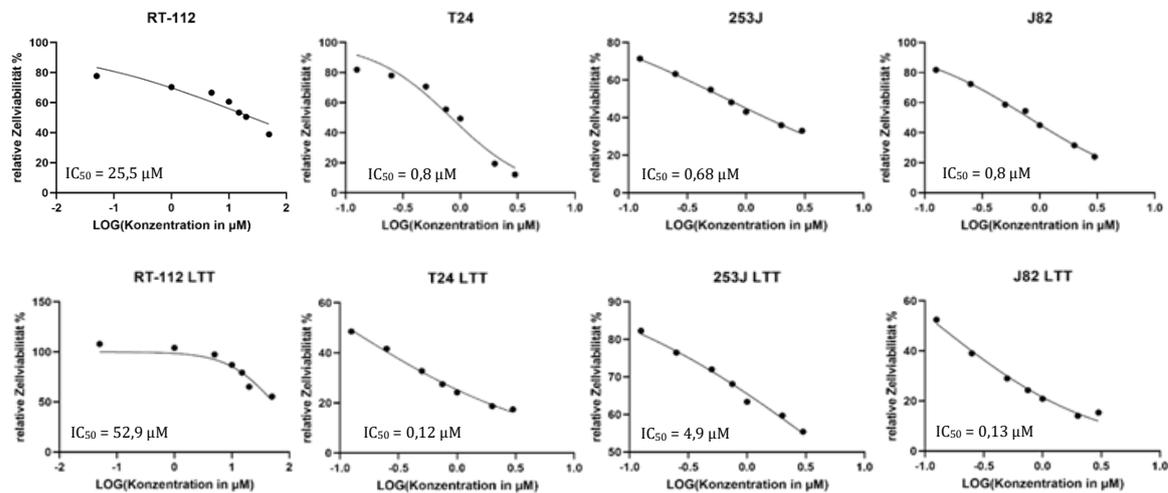


Abb. 23: Dosiswirkungskurven nach Behandlung der parentalen und Cisplatin-resistenten UCCs mit Talazoparib. Dargestellt ist die logarithmierte Konzentration des PARPi Talazoparib auf der x-Achse und die jeweilige relative Zellviabilität auf der y-Achse. Die Graphen zeigen die Zellviabilität in Abhängigkeit zur Talazoparib-Konzentration der Cisplatin-sensitiven und -resistenten UC-Zelllinien, sowie die jeweiligen Zelllinien-spezifischen IC_{50} -Werte.

Wie auch bei Olaparib zeigte sich bei RT-112 der höchste IC_{50} unter den parentalen Zelllinien (= 25,5 μM). Allerdings war bei Talazoparib der Unterschied zu den anderen Zelllinien wesentlich größer als bei Olaparib. Außer bei RT-112 befanden sich alle IC_{50} -Werte für die parentalen Zelllinien unter 1 μM : T24 und J82 hatten einen IC_{50} von 0,8 μM , 253J lag als sensitivste parentale Zelllinie bei 0,68 μM . Auch bei den Cisplatin-resistenten LTTs reagierte, wie auch bei Olaparib, die Zelllinie RT-112 LTT am wenigsten sensibel auf die Einzelbehandlung mit dem PARPi (IC_{50} = 52,9 μM). Für 253J LTT wurde ein IC_{50} für Talazoparib von 4,9 μM definiert. J82 LTT und T24 LTT sprachen am sensibelsten auf die Behandlung an mit einem IC_{50} von 0,13 μM für J82 LTT und 0,12 μM für T24 LTT. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe waren bereits die IC_{50} -Werte für die Zelllinien UM-UC-3 (= 1,0 μM), VM-CUB1 (= 1,0 μM), sowie die Kontrollzelllinie HBLAK (= 1,0 μM) bekannt. Tabelle 38 zeigt die IC_{50} -Werte beider PARPi im direkten Vergleich. Die Abstufung der Grautöne gibt einen visuellen Eindruck der unterschiedlich hohen IC_{50} -Werte.

Tabelle 38: Direkter Vergleich der Zelllinien-spezifischen IC₅₀-Werte für Olaparib und Talazoparib. Anhand der Graustufungen werden die unterschiedlich hohen Dosierungen visualisiert, wobei dunkle Felder hohe Dosierungen und helle Felder niedrige Dosierungen markieren.

	Olaparib	Talazoparib
	IC ₅₀ nach 72 Stunden in μM	IC ₅₀ nach 72 Stunden in μM
RT-112	97.2	25.5
T24	18.6	0.8
253J	51.6	0.68
J82	52.7	0.8
RT-112 LTT	80.9	52.8
T24 LTT	5.0	0.12
253J LTT	43.1	4.9
J82 LTT	12.1	0.13
HBLAK	9.5	1.0
UM-UC-3	11.0	1.0
VM-CUB1	19.9	1.0

Die direkte Gegenüberstellung der beiden PARPi in Tabelle 38 zeigte deutlich, dass alle UCCs, sowohl die Cisplatin-sensitiven als auch ihre resistenten Sublinien sensitiver auf die Einzelbehandlung mit Talazoparib reagierten als auf die Einzelbehandlung mit Olaparib. Vergleich man jedoch die vier parentalen Zelllinien mit ihren jeweiligen LTTs so konnte bei Talazoparib nicht festgestellt werden, dass alle LTTs einen niedrigeren IC₅₀-Wert hatten als ihre parentalen Gegenstücke, wie es bei Olaparib der Fall war. Die LTTs zeigten sich also nicht alle sensitiver gegenüber der Behandlung mit Talazoparib als ihre jeweiligen parentalen Gegenstücke. Die Kontrollzelllinie HBLAK hatte ebenfalls einen niedrigeren IC₅₀-Wert für Talazoparib als für Olaparib. Hierbei war hervorzuheben, dass HBLAK für Talazoparib mit 1 μM einen höheren IC₅₀-Wert hatte, als die meisten UCCs, die sich, mit Ausnahme von RT-112, RT-112 LTT und 253J LTT alle unterhalb von 1 μM befanden.

Im nächsten Schritt sollte nun Talazoparib in Kombination mit dem BETi PLX auf alle acht Zelllinien angewandt werden. Dazu wurden, wie bei der Kombination von PLX mit Olaparib die individuellen IC₅₀-Werte für die einzelnen Zelllinien für die beiden Substanzen in aufsteigenden Abstufungen miteinander kombiniert (siehe Tabelle 33 für die genaue Darstellung der Konzentrationsabstufungen). Mittels MTT-Test wurde die relative Viabilität der acht Zelllinien nach der Behandlung gemessen und auf Basis der Methode nach Chou-Talalay eine Synergie-Analyse durchgeführt. In Abb. 24 sind die daraus entstandenen *Combination-Index Plots* dargestellt.

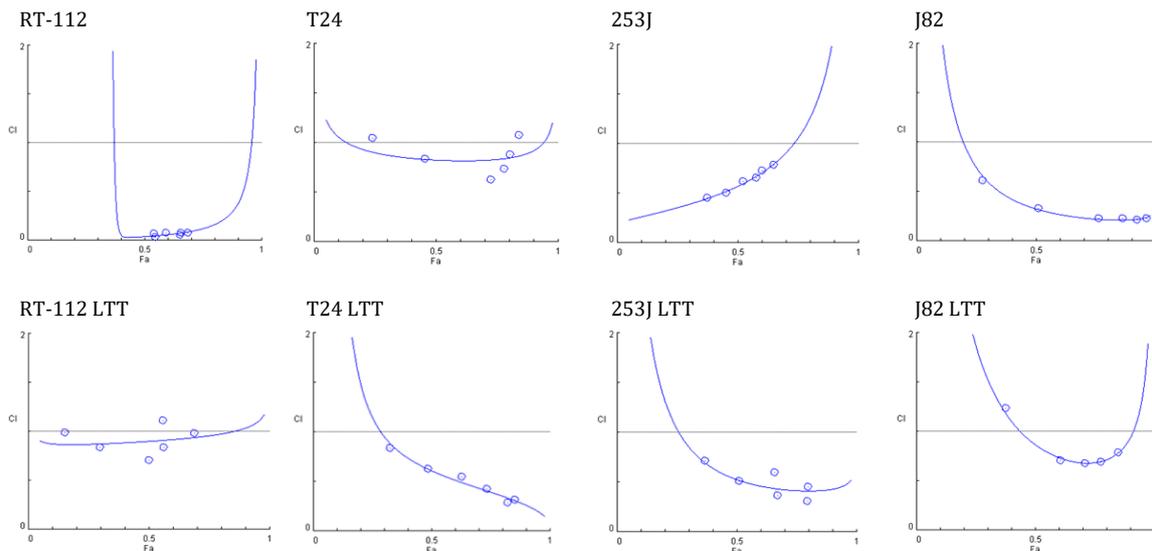


Abb. 24: Chou-Talalay Analyse der Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX. Die obere Reihe zeigt die Ergebnisse der Synergieanalyse der Cisplatin-sensiblen UCCs, die untere Reihe zeigt die Ergebnisse der Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien. Auf der x-Achse ist die *Fraction affected* (1-relative Viabilität = Anzahl der toten Zellen) abgebildet. Auf der y-Achse ist der *Combination Index* (CI) dargestellt. $CI < 1$ zeigt einen Synergismus, $CI = 1$ zeigt einen additiven Effekt, $CI > 1$ zeigt einen antagonistischen Effekt.

In allen acht behandelten Zelllinien war ein synergistischer Effekt der Kombinationsbehandlung von Talazoparib und PLX festzustellen ($CI < 1$). Wie auch bei der Kombination des BETi mit Olaparib war sowohl bei den Cisplatin-sensitiven als auch bei den -resistenten Zelllinien ein zusätzlicher Effekt durch die Kombination der beiden Substanzen zu erkennen. Es konnte beobachtet werden, dass der Effekt der Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX in der Zelllinie J82 LTT stärker war als bei der Kombination mit Olaparib. Dennoch kann abschließend festgehalten werden, dass beide PARPi in Kombination mit PLX eine vergleichbare Wirksamkeit in den Cisplatin-resistenten Zelllinien zeigen konnten.

4.10 Einfluss der Behandlung auf die Genexpression

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Mono- sowie die Kombinationstherapien mit dem PARPi Olaparib und dem BETi PLX auf die Genexpression der Zellen haben, wurden die Zelllinien RT-112, T24, 253J, wie auch die Cisplatin-resistenten Sublinien RT-112 LTT, T24 LTT und 253J LTT mit Olaparib und PLX als Monotherapie als auch in Kombination behandelt und die Genexpression mittels qRT-PCR gemessen. Grundlage für die Auswahl geeigneter Gene waren Daten aus Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierungen, die bei Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erstellt wurden. Hieraus standen verschiedenen Datensätze zur Verfügung: 1) differentiell exprimierte Gene nach 72h PLX-Behandlung von VM-CUB1, UM-UC-3 und HBLAK im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, 2) differentiell exprimierte Gene in

Cisplatin-resistenten LTTs im Vergleich zu ihren Parental-Zelllinien, 3) differentiell exprimierte Gene zwischen verschiedenen UCCs und der benignen Kontrolllinie HBLAK.

Aus Datensatz 1 konnten Kandidaten zur Dokumentation von Verschiebungen in der DNA-Reparatur durch PLX abgeleitet werden, die in den eigens behandelten Proben aus der Kombinationstherapie untersucht werden sollten. Zahlreiche Gene, die mit der HR-Reparatur assoziiert sind, waren nach PLX-Behandlung vermindert exprimiert. Um zu überprüfen, ob die Expressionsreduktion von HR-assoziierten Genen nach Behandlung mit PLX auch bei den für dieses Projekt angefertigten Proben von parentalen und Cisplatin-resistenten LTTs nach Behandlung mit PLX allein bzw. in Kombination mit dem PARPi nachweisbar war, wurden die beiden am stärksten veränderten Gene *RAD51* und *FANCD2* im Zuge dieses Projektes mittels qRT-PCR validiert. Daraus ist abzulesen, dass PLX auch in den UCCs RT-112, T24 und 253J, sowie in ihren Cisplatin-resistenten Sublinien eine Verminderung des Gens *RAD51* bewirkte (Abb. 25). Allerdings war die Veränderung nur sehr gering (höchster FC = -0,7 bei RT-112), so dass dieses Ergebnis nicht als biologisch relevant angesehen werden konnte. Gleiches gilt für die Kombinationsbehandlung.

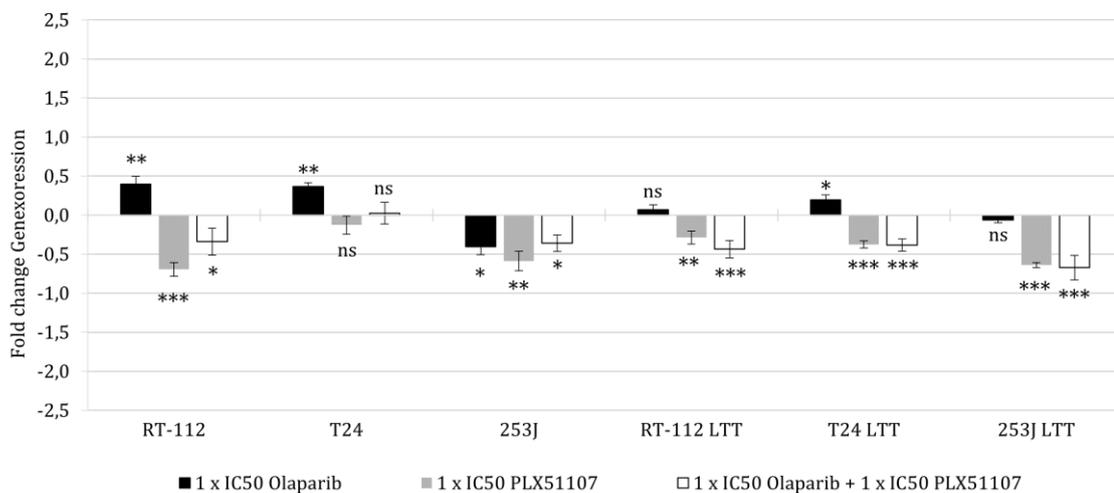


Abb. 25: Veränderung der *RAD51*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Bei der Messung der *FANCD2*-Genexpression fiel auf, dass die Einzelbehandlung mit dem PARPi Olaparib keine biologisch relevante Veränderung bewirken konnte (Abb. 26). PLX wiederum zeigte in vier der sechs gemessenen Zelllinien einen relevanten FC von $\geq 1,5$. Den stärksten Effekt konnte man bei T24 LTT feststellen (FC = -2,3), gefolgt von 253J LTT

(FC = -2,0). Interessanterweise zeigten beide Cisplatin-resistenten Sublinien eine stärkere Veränderung als ihre parentalen Gegenstücke (T24 FC = -1,9, 253J FC = -1,5). Lediglich bei RT-112 und RT-112 LTT war dieser starke Effekt nicht zu beobachten (RT-112 FC = -1,1, RT-112 LTT FC = -0,9). Die Expressionsveränderungen nach Kombinationsbehandlung entsprachen im Wesentlichen dem PLX-Effekt.

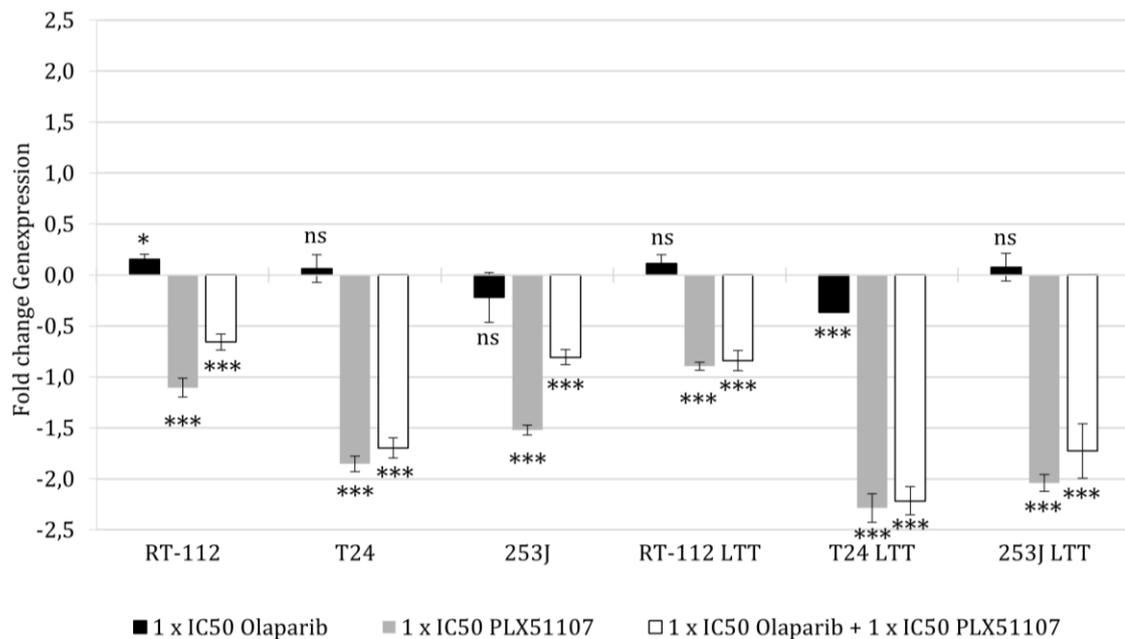


Abb. 26: Veränderung der *FANCD2*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Neben *RAD51* und *FANCD2* wurden im Zuge dieses Projektes auch die beiden Gene *BRCA1* und *BRCA2* gemessen. Aus anderen Tumorentitäten, wie dem Mammakarzinom oder dem Ovarialkarzinom ist bekannt, dass PARPi vor allem bei BRCA-mutierten Varianten einen guten therapeutischen Effekt bringen. Aus diesem Grund war es wichtig zu überprüfen, ob PLX eine solche *BRCAness* hervorruft, die einen Erklärungsansatz für den synergistischen Effekt der Kombinationstherapie liefern könnte. In den Abb. 27 und Abb. 28 sind die Daten zu sehen, die mithilfe der qRT-PCR gemessen wurden. In keiner der getesteten Zelllinien konnte ein biologisch relevanter FC bei der Genexpression von *BRCA1* und *BRCA2* gemessen werden. Den höchsten Ausschlag zeigte die Kombinationstherapie von Olaparib und PLX auf die parentale Zelllinie T24 mit einem FC von 1,3 für *BRCA2*. Die biologisch relevante Veränderung der *BRCA*-Genexpression durch den BETi, wie sie in den RNAseq-Daten zu sehen war, konnte

somit nicht mit den eigenen Zelllinien bestätigt werden. Durch Kombinationsbehandlung waren eher schwächere oder sogar gegenläufige Veränderungen hervorgerufen worden.

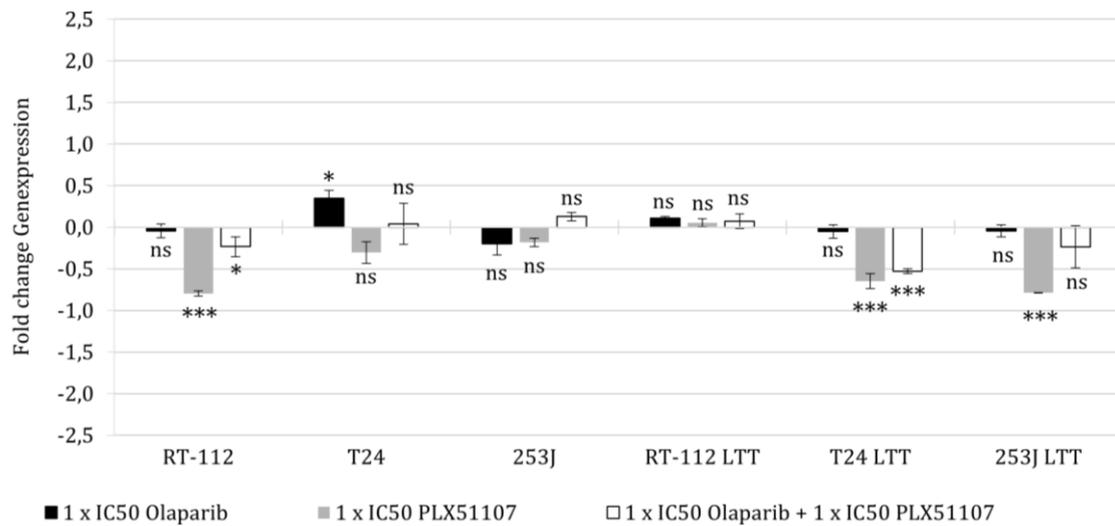


Abb. 27: Veränderung der BRCA1-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

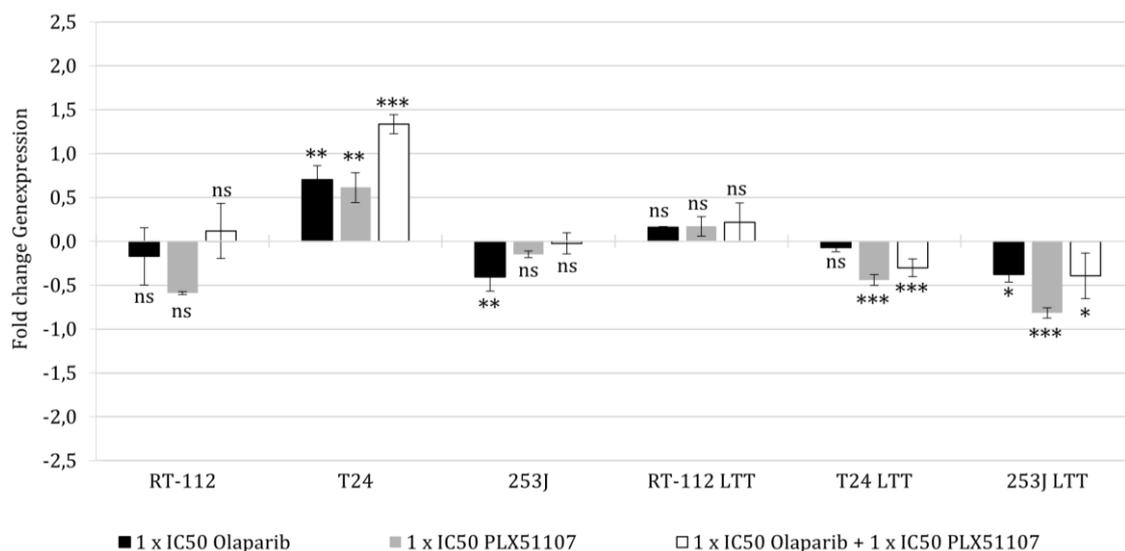


Abb. 28: Veränderung der BRCA2-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Da bisher für die klassischen HR-assoziierten Gene keine signifikanten Veränderungen in den eigenen PLX-behandelten Zelllinien-Paaren gemessen werden konnten, wurde als nächstes der NHEJ-DNA-Reparatur Signalweg betrachtet. Es wird angenommen, dass PLX als BETi dazu führt, dass der HR-Reparaturweg herunterreguliert wird und somit der NHEJ-Reparaturweg für die Zelle an Bedeutung gewinnt. Dies sollte im nächsten Schritt überprüft werden. Als klassische Komponente des NHEJ-Reparaturwegs wurde die *NHEJ1*-Expression per qRT-PCR gemessen (Abb. 29). Diese wurde in allen Zelllinien durch die Behandlung mit PLX induziert, allerdings lag bei allen Proben der FC unterhalb des Grenzwertes von $\pm 1,5$. Dem gegenüber stand das Ergebnis der Behandlung mit dem PARPi Olaparib: In allen Zelllinien konnte ein negativer FC festgestellt werden. Allerdings konnte auch hier nicht von einer biologischen Relevanz ausgegangen werden. Durch diese gegenläufige Wirkung fielen die Effekte der Kombinationsbehandlung kleiner aus als für die PLX-Monobehandlung.

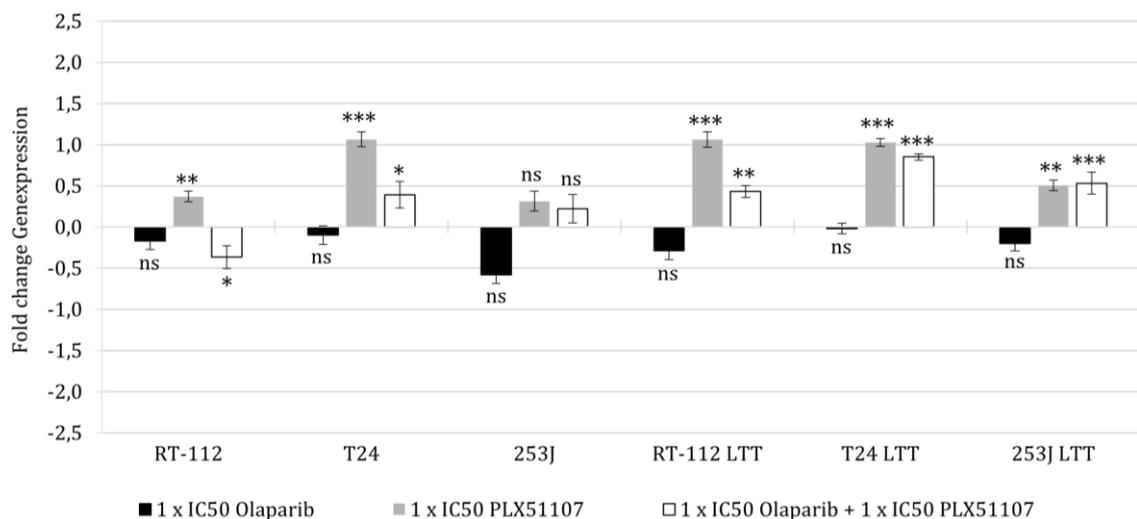


Abb. 29: Veränderung der *NHEJ1*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Neben der *NHEJ1*-Expression wurden außerdem die Gene *PARP1* und *PARP2* als Komponenten der NHEJ-Reparatur betrachtet. Die Messung der Veränderung der Genexpression von *PARP1* und *PARP2* war im Zuge dieses Projektes vor allem deswegen relevant, da diese in direktem Zusammenhang mit der Wirkungsweise der PARPi stehen. Bei der Expression von *PARP1* konnte festgestellt werden, dass die Wirkung der Kombinationsbehandlung in den meisten Zelllinien der Monobehandlung überlegen war. Bei

den parentalen Zelllinien T24 und 253J konnte eine deutlich stärkere Herunterregulierung des *PARP1*-Gens durch die Kombination im Gegensatz zur Monobehandlung mit Olaparib gezeigt werden, obwohl die Monobehandlung aus PLX in beiden Fällen eher zu einer Hochregulierung des Gens geführt hatte. Bei den resistenten Linien RT-112 LTT und 253J LTT kam es sogar zu einer erhöhten Genexpression von *PARP1* durch Olaparib allein, bei der Kombination aber dennoch zu einer Reduktion der Genexpression. Insgesamt bewegten sich diese Ergebnisse aber alle nicht im biologisch relevanten Bereich (Abb. 30).

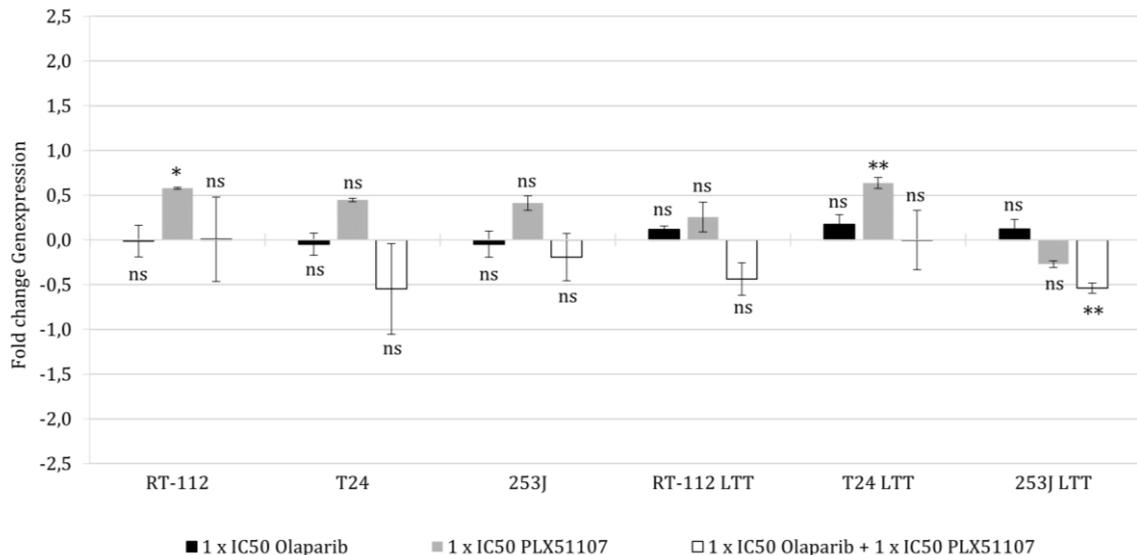


Abb. 30: Veränderung der *PARP1*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Bei der Messung der Genexpression von *PARP2* zeigte sich in allen Zelllinien eine deutlich stärkere Reduktion der *PARP2*-Expression durch die Behandlung mit PLX allein als durch die Monotherapie mit dem PARPi Olaparib. In der LTT-Zelllinie T24 war dieser Effekt sogar im biologisch relevanten Bereich mit einem FC = -1,76. Die Kombination war in den Zelllinien 253J, RT-112 LTT und 253J LTT effektiver als die PLX-Monobehandlung, in den übrigen Zelllinien kam es zu einer geringeren Reduktion des *PARP2*-Gens durch die Kombinationsbehandlung (Abb. 31).

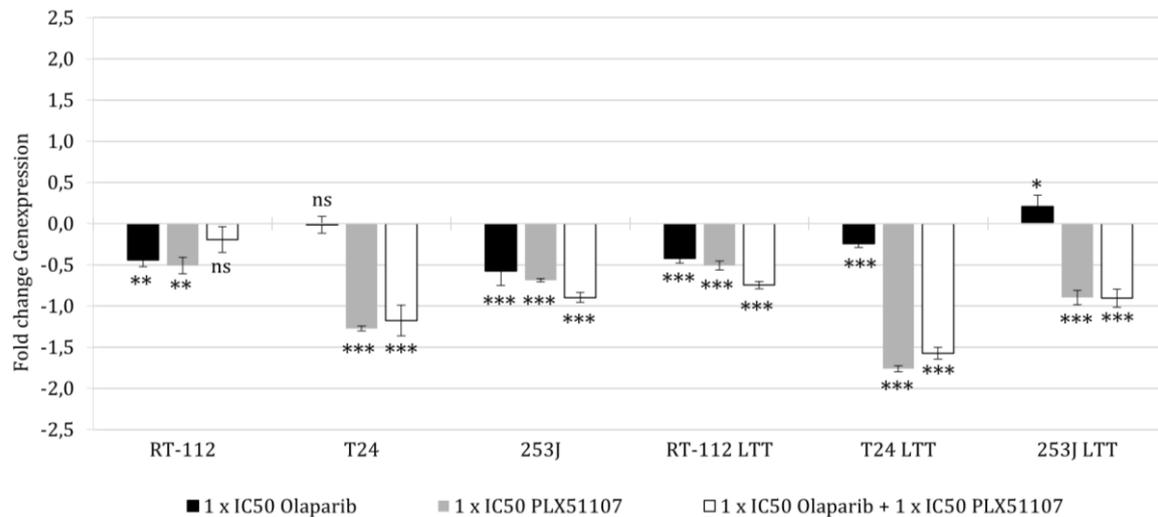


Abb. 31: Veränderung der *PARP2*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Neben dem HR- und dem alternativen NHEJ-Reparaturweg sind Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden auf einen dritten Reparaturweg angewiesen: den *Nucleotide excision repair*-Weg (NER). Dieser ist vorrangig dafür zuständig große und sperrige DNA-Fragmente zu beseitigen bzw. zu reparieren (Duan et al., 2020). Daher wurden NER-assoziierte Gene in den RNAseq Daten betrachtet. Die mit Abstand deutlichste Genexpressionsveränderung durch PLX-Behandlung wurde für das *POLE2*-Gen festgestellt. Auffällig war, dass UM-UC-3 neben *POLE2* nur noch das Gen *GTF2H2* schwach herunterreguliert hatte. Weitere Gene der NER, die auffällige Expressionsveränderungen aufwiesen, waren *RFC3/4/5*, *ERCC8* und *POLD3*. Daher wurden *POLE2* und *POLD3*, sowie *ERCC2* mittels qRT-PCR in den eigenen Proben gemessen. Darüber hinaus wurde auch *ERCC1* gemessen, da vor allem die *ERCC*-Gene im Zusammenhang stehen mit Cisplatin-Resistenzen und somit auch mit dem NER-Weg der Zelle. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Messungen aufgeführt.

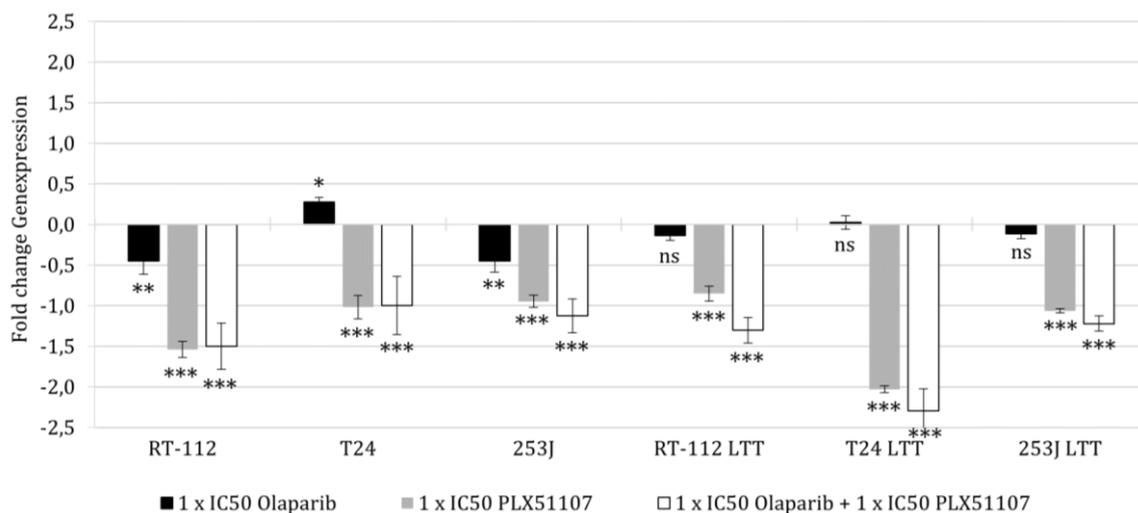


Abb. 32: Veränderung der *POLE2*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

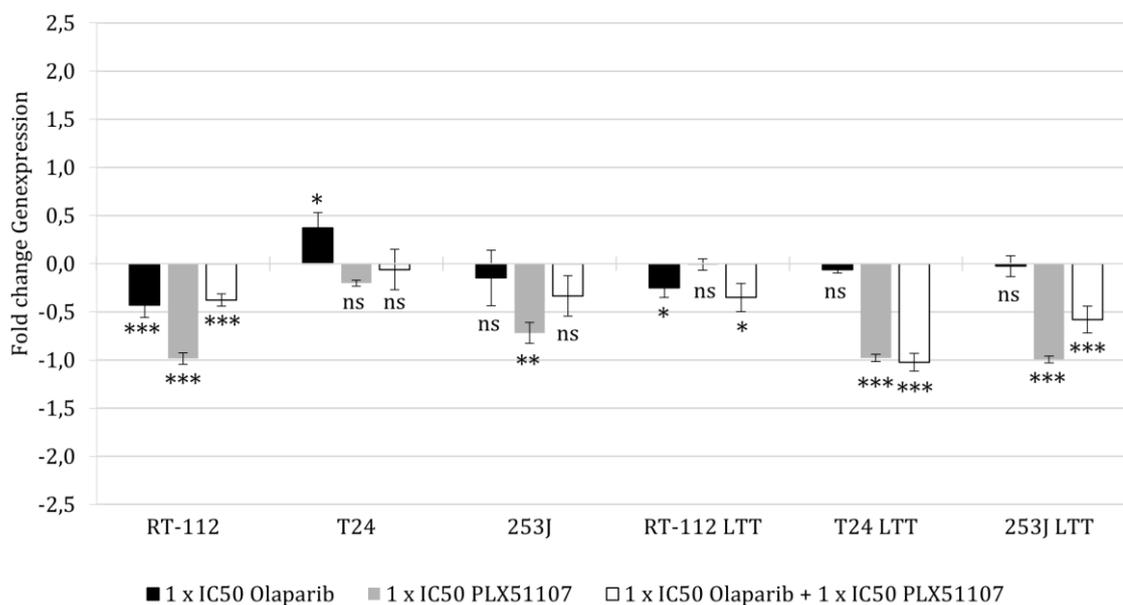


Abb. 33: Veränderung der *POLD3*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Abb. 32 zeigt, dass auch in den hier gemessenen Zelllinien die *POLE2*-Genexpression durch die Behandlung mit PLX herabgesenkt wurde. In den Zelllinien RT-112 und T24 LTT zeigte sich sogar ein biologisch relevanter FC von $\leq -1,5$ (RT-112 FC = -1,5, T24 LTT FC = -2,0). Erstmals wurden hier durch die Kombinationsbehandlung teilweise stärkerer Effekte als durch die Monobehandlung beobachtet. Der gleiche Trend war auch in der Veränderung der *POLD3*-Genexpression nachweisbar (Abb. 33). Auch hier bewirkte die Behandlung mit PLX in allen sechs Zelllinien ein Absinken der Genexpression, allerdings nicht im biologisch relevanten Bereich von $\pm 1,5$ FC.

Die Analyse der *ERCC*-Gengruppe ergab ein stärker heterogenes Bild. Bei den parental Linien RT-112 und 253J kam es durch die Behandlungen zur Hochregulierung des Gens *ERCC2*, bei T24 zur Herunterregulierung. Bei den LTTs zeigte sich ein genau gegenteiliger Effekt - bei RT-112 LTT und 253J LTT war *ERCC2* herunterreguliert, bei T24 LTT hochreguliert. Bei T24, RT-112 LTT und 253J LTT konnte allerdings bei der Kombinationsbehandlung ein deutlich verringerter FC im Vergleich zur Monobehandlung dargestellt werden (Abb. 34).

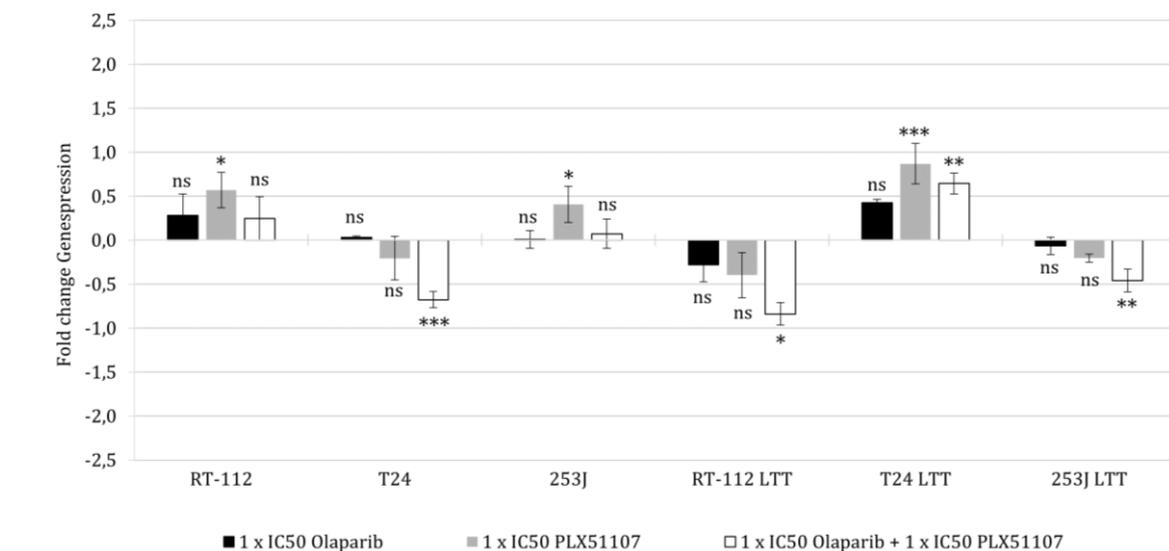


Abb. 34: Veränderung der *ERCC2*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Die Expression des *ERCC1*-Gens folgte ebenfalls keinem homogenen Bild nach der Behandlung mit den unterschiedlichen Substanzen (Abb. 35). Dennoch konnte beobachtet werden, dass es in allen LTTs zu einer Herunterregulierung durch PLX kam. Auch die

Kombinationsbehandlung bewirkte in allen LTTs eine Herunterregulierung, die aber bei den meisten Zelllinien schwächer ausfiel als die Monobehandlung mit PLX. Insgesamt waren die Veränderungen sowohl bei *ERCC2* als auch bei *ERCC1* nicht im biologisch relevanten Bereich.

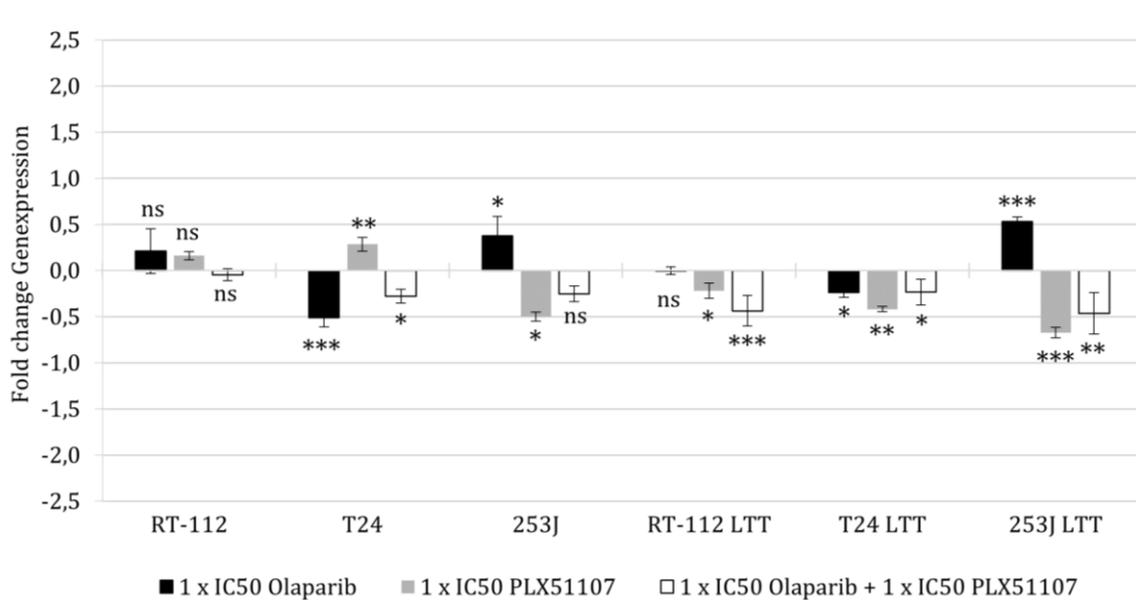


Abb. 35: Veränderung der *ERCC1*-Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien RT-112, T24, 253J, sowie in den jeweiligen LTT-Zelllinien nach Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse ist die Zelllinie aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der behandelten Proben zur DMSO-Kontrollprobe dargestellt. Signifikanzniveau im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle: ***= $p \leq 0,001$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant.

Zusammenfassend konnten in den hier dargestellten Untersuchungen teils deutliche Genexpressionsveränderungen durch die Behandlungen mit PLX, Olaparib und die Kombination der beiden gezeigt werden. In den getesteten Zelllinien kam es nach PLX-Behandlung zu einer teils deutlichen Reduktion der Genexpression von Genen der HR-Reparatur. *RAD51* zeigte sich sowohl in den RNAseq-Daten als auch in den eigenen Zelllinien nach PLX-Behandlung vermindert. Ebenso konnte eine deutliche Reduktion der Expression des *FANCD2*-Gens nach PLX-Behandlung gemessen werden, welche sich vor allem bei den Cisplatin-resistenten Zelllinien auch im biologisch relevanten Bereich befand. Eine relevante Expressionsveränderung der BRCA-Gene konnte allerdings nicht belegt werden. Bei der Messung der *NHEJ1*-Expression konnte in allen Zelllinien eine Induktion durch die Behandlung mit PLX gemessen werden. Als Stellvertreter für den NER-Reparaturweg wurden *POLE2*, *POLD3* und die zwei *ERCC*-Gene gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl *POLE2* als auch *POLD3* durch PLX in allen Zelllinien herunterreguliert wurde. Die Expression der *ERCC*-Gene zeigten insgesamt ein sehr heterogenes Bild. Abschließend war für *PARP1* bei den meisten Zelllinien ein zunehmender Effekt bei der

Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Monotherapie festzustellen. Allerdings waren die meisten gemessenen Werte nicht signifikant und auch nicht biologisch relevant. *PARP2* wiederum war in fast allen Zelllinien vor allem durch PLX deutlich reduziert. Der Effekt des *PARPi* Olaparib war in allen Zelllinien geringer.

4.11 Identifizierung möglicher Faktoren, die das *PARPi*-Ansprechen bestimmen

Die zuvor dargestellten Ergebnisse konnten zeigen, dass es einen synergistischen Effekt beider *PARPi* (Olaparib und Talazoparib) mit dem *BETi* PLX gab. Zusätzlich dazu konnte aber auch ein wesentlicher Unterschied bezüglich des Ansprechens auf *PARPi* zwischen den einzelnen Zelllinien festgestellt werden. Tabelle 38 zeigte den direkten Vergleich der beiden Substanzen Olaparib und Talazoparib und machte durch die Grauabstufungen deutlich, dass vor allem die Zelllinie RT-112, sowie RT-112 LTT besonders resistent gegenüber *PARPi* waren. Zusätzlich dazu konnte bei den meisten dargestellten Zelllinien sowohl bei Olaparib als auch bei Talazoparib festgestellt werden, dass die LTTs sensitiver gegenüber der Monotherapie mit dem *PARPi* reagierten als ihre parentalen Gegenstücke. Mithilfe der zwei weiteren RNAseq-Datensätze sollten nun mögliche endogene Genexpressionsmuster ermittelt werden, die zum einen eine Erklärung für die Resistenz von RT-112 und RT-112 LTT gegenüber *PARPi* liefern könnten und zum anderen die bessere Sensitivität der LTTs erklären könnten. Im Umkehrschluss könnte dies Anhaltspunkte bezüglich der Wirkungsweise der Substanz liefern und folglich mögliche Biomarker für das Ansprechen auf die Behandlung mit *PARPi* zeigen.

Auf Basis publizierter Übersichtsartikel (Rose et al., 2020, Noordermeer and van Attikum, 2019) zu Resistenzmechanismen gegenüber *PARPi* wurden Gene definiert, die potenziell an der Vermittlung von Sensitivität bzw. Resistenz beteiligt sind. Die mittels RNAseq identifizierten differentiell exprimierten Gene zwischen parentalen Zelllinien und deren Cisplatin-resistenten LTT-Sublinien bzw. zwischen fünf UCCs und HBLAK wurden daher mit den selbst aus der Literatur erstellten Kandidatenlisten abgeglichen und Diagramme erstellt.

4.11.1 Genexpressionsunterschiede von RT-112 vs. HBLAK im Vergleich zu anderen UCCs vs. HBLAK

Um mögliche Faktoren zu identifizieren, die eine *PARPi*-Resistenz (wie im Fall von RT-112) regulieren könnten, sind in Abb. 36 die Gene dargestellt, die bei den parentalen Zelllinien (VM-CUB1, UM-UC-3, RT-112, T24 und J82) mindestens mit einem $FC \pm 1,5$ differentiell gegenüber der Kontrollzelllinie HBLAK exprimiert waren.

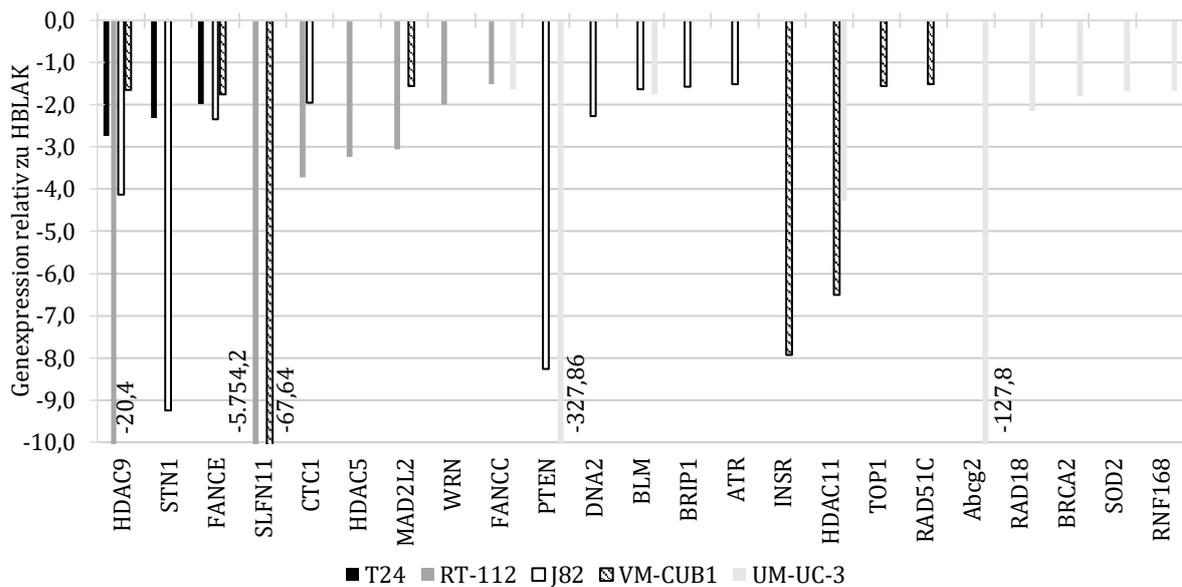


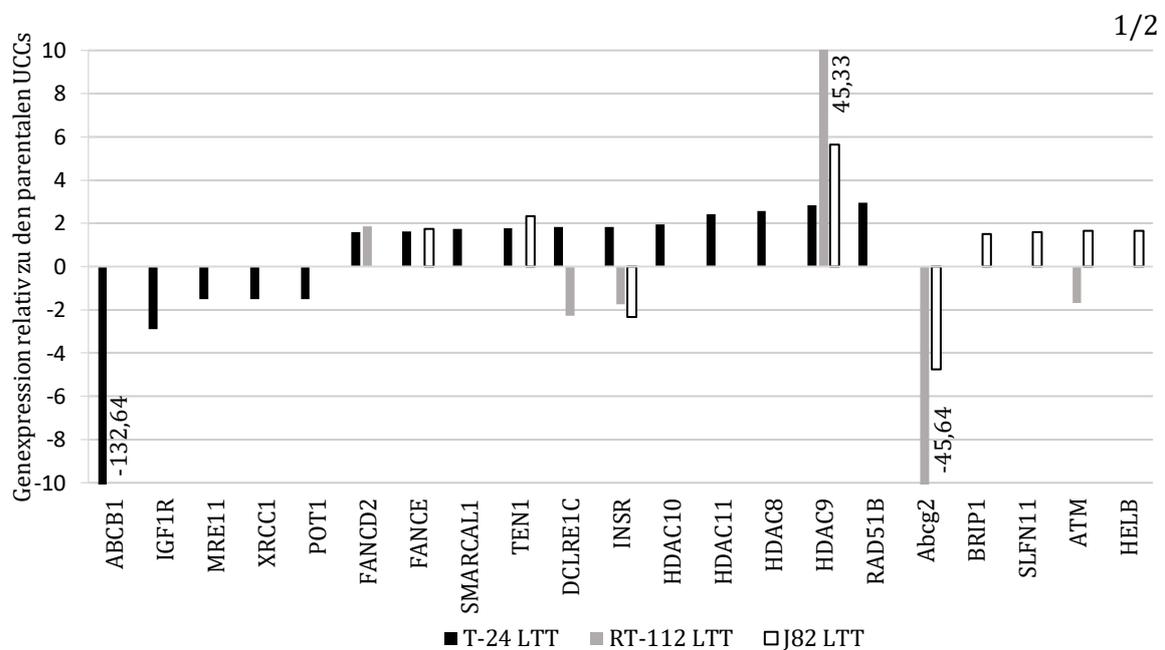
Abb. 36: Expression PARP-assoziiierter Gene in den UCCs T24, RT-112, J24, VM-CUB1 und UM-UC-3. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen relativ zur Kontrollzelllinie HBLAK. Auf der x-Achse sind die einzelnen Gene aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der Genexpression relativ zur HBLAK-Kontrollprobe dargestellt. Die y-Achse wurde zur besseren Anschauung bei -10 beendet. Bei Überschreiten der Skala sind die wahren Werte neben den Balken aufgeführt.

Zunächst fiel in Abb. 36 auf, dass bei allen UCCs alle dargestellten PARP-assoziierten Gene im Gegensatz zu HBLAK herunterreguliert wurden und kein Gen induziert wurde. Darüber hinaus war anzumerken, dass das tatsächliche Angriffsziel des PARPi, nämlich die Gene *PARP1* und *PARP2*, nicht in der Graphik abgebildet waren, da hier kein FC $\pm 1,5$ gemessen werden konnte. Die stärkste Veränderung, die in den UCCs relativ zur Kontrollzelllinie beobachtet werden konnte, war in den Genen *SLFN11*, *PTEN* und *ABCG2*. Der FC des Gens *SLFN11* lag bei der resistentesten Zelllinie RT-112 bei -5.754,2 und war damit deutlich herunterreguliert. Bei VM-CUB1 lag der FC bei -67,7. Bei den anderen UCCs war keine Veränderung des *SLFN11*-Gens festzustellen. *PTEN* wiederum war vor allem in der Zelllinie UM-UC-3 stark herunterreguliert mit einem FC von -327,9. Auch in J82 konnte für *PTEN* ein negativer FC von -8,3 gemessen werden. Das *ABCG2*-Gen war lediglich in UM-UC-3 herunterreguliert, hier aber deutlich mit einem FC von -127,8. Für *MAD2L2* konnte ein verminderter FC von -3,1 für RT-112, sowie -1,5 für VM-CUB1 gemessen werden. *WRN* wiederum war nur in RT-112 vermindert mit einem FC von -2,0. Das Gen *HDAC9* zeigte in allen UCCs außer UM-UC-3 einen negativen FC. Die stärkste Veränderung war auch hier in der resistenten Zelllinie RT-112 zu sehen mit einem FC von -20,4, gefolgt von J82 (FC = -4,1), T24 (FC = -2,7) und VM-CUB1 (FC = -1,6).

Besonders in RT-112 auffällig herabregulierte Gene waren also *HDAC9*, *SLFN11*, *CTC1*, *HDAC5*, *MAD2L2* und *WRN*. Diese kämen als Kandidaten für ein vermindertes Ansprechen auf PARPi in Betracht und müssten zukünftig durch Expressionsmodulation und anschließende Dosiswirkungskurven funktionell untersucht werden.

4.11.2 Genexpressionsunterschiede zwischen LTTs vs. parental UCCs

Da die LTTs grundsätzlich sensitiver gegenüber PARPi waren als Ihre Parental-Zelllinien, wurde ein weiterer Vergleich für PARP-Response-assoziierte Gene angestellt. Abb. 37 zeigt die veränderte Genexpression PARP-assoziiierter Gene der Cisplatin-resistenten LTTs relativ zu ihren parental UCCs. Aufgeführt sind nur die Gene mit einem FC $\pm 1,5$. Die Aufteilung in zwei Graphen dient lediglich der besseren Übersicht und hat keinen inhaltlichen Grund. Die unterschiedlichen Skalierungen der Ordinate sind zu beachten.



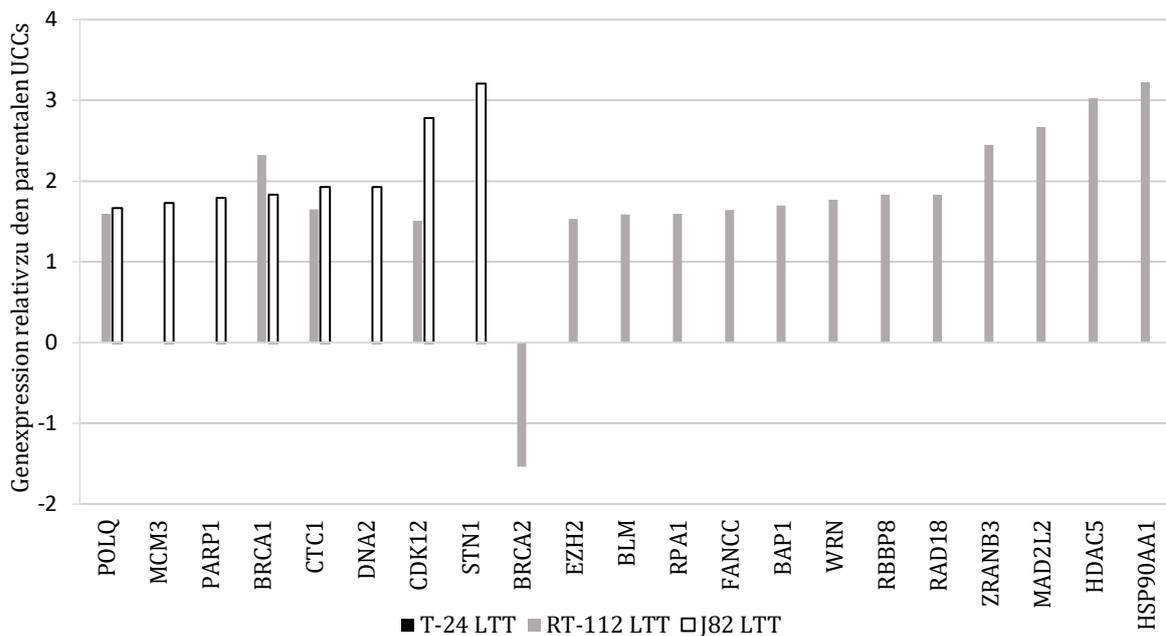


Abb. 37: Expression PARP-assoziiierter Gene in den Cisplatin-resistenten Zelllinien T24 LTT, RT-112 LTT und J24 LTT. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen relativ zu den jeweiligen parental UCCs T-24, RT-112 bzw. J82. Auf der x-Achse sind die einzelnen Gene aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der Genexpression relativ zu ihren jeweiligen parental UCCs dargestellt. Die x-Achse wurde zur besseren Übersicht auf zwei Graphen aufgeteilt. Die y-Achse des oberen Graphen wurde zur besseren Anschauung bei -10 beendet. Bei Überschreiten der Skala sind die wahren Werte neben den Balken aufgeführt.

Die beiden Graphen in Abb. 37 zeigen, dass es bei den LTTs Veränderungen hinsichtlich der Genexpression im Vergleich zu den jeweiligen parental Gegenstücken gab. Es konnten sowohl Zunahmen der Genexpression als auch einige starke Reduktionen festgestellt werden. Die deutlichsten Reduktionen waren bei den beiden aufgeführten *ABC*-Genen zu beobachten: *ABCB1* und *ABCG2*. Bei beiden handelt es sich um Gene, die für *Multidrug-Resistance* Proteine kodieren. Eine Herabregulation könnte ein Grund für eine höhere Sensitivität sein.

Die Genexpression von *HDAC9* war bei den LTTs teilweise sehr stark erhöht, in allen drei Cisplatin-resistenten Zelllinien war ein Anstieg messbar. *HDAC9* war das einzige Gen, das in allen drei Zelllinien den gleichen Trend der Veränderung in der Genexpression zeigte.

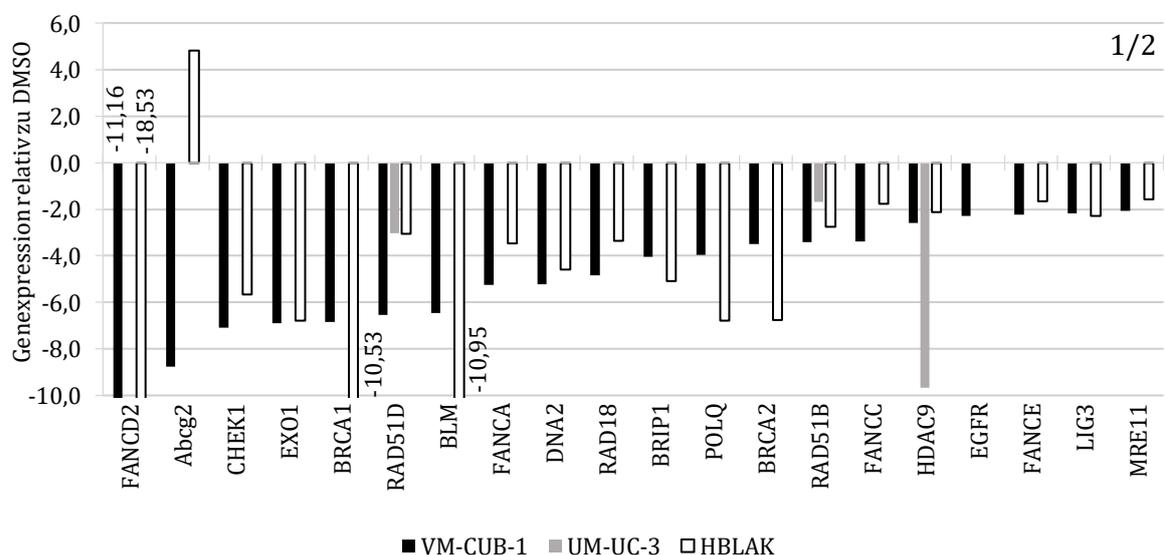
Bei den Ergebnissen der RNAseq-Daten der parental Zelllinien war aufgefallen, dass die Gene *MAD2L2* und *WRN* vor allem in der resistenten Zelllinie RT-112 herunterreguliert waren. Daher war bei der Datenauswertung der LTTs auffällig, dass genau diese Gene in der Cisplatin-resistenten RT-112 LTT überexprimiert waren.

Darüber hinaus waren auch die Genexpressionsveränderungen von *SMARCAL1*, *MRE11* und *EZH2* interessant. Grund dafür war, dass diese drei Gene alle in Zusammenhang mit der Stabilität der DNA-Replikationsgabel im Falle eines DNA-DSB stehen. Zwei dieser Gene, nämlich *SMARCAL1* und *MRE11* zeigten auch eine Veränderung in den PLX-behandelten Zellen, die einen eventuellen Anhaltspunkt für die Mechanismen hinter der synergistischen Wirkung von PLX und PARPi liefern könnten. Die Ergebnisse dazu werden im nachfolgenden Kapitel gezeigt. Bei den LTTs zeigte sich also ein positiver FC für *SMARCAL1* in T24 LTT, sowie eine Reduktion der *MRE11* Genexpression ebenfalls in T24 LTT. *EZH2* war lediglich in RT-112 LTT verändert. Anders als bei den parental UCCs war bei J82 LTT außerdem das Gen *PARP1* induziert. Bei den beiden anderen LTTs war allerdings keine Veränderung zu beobachten.

Dieser Auswertevergleich ergab also eine ganze Reihe von Kandidaten, die zur verstärkten Sensitivität von LTTs gegenüber PARPi beitragen könnten. Solche wie die ABC-Gene und die dadurch induzierten Proteine, sowie die Gene *HDAC9*, *MAD2L2* oder *WRN* sollten zukünftig dahingehen näher untersucht werden.

4.11.3 Expressionsunterschiede PARP-assoziierter Gene zwischen PLX-behandelten UCCs vs. unbehandelten UCCs

PARPi haben in Kombination mit dem BETi PLX einen synergistischen Effekt bei der Behandlung der hier gemessenen UCCs zeigen können. In den zuvor dargestellten Ergebnissen konnte ein Einblick in die Expression PARP-assoziierter Gene in unbehandelten parental UCCs, sowie LTTs gewonnen werden. Um die Synergie mit PLX besser verstehen und erklären zu können, wurde die Liste der PARP-assozierten Gene im nächsten Schritt mit den RNAseq-Daten der mit PLX behandelten UCCs VM-CUB1 und UM-UC-3, sowie der Kontrollzelllinie HBLAK verglichen (Abb. 38).



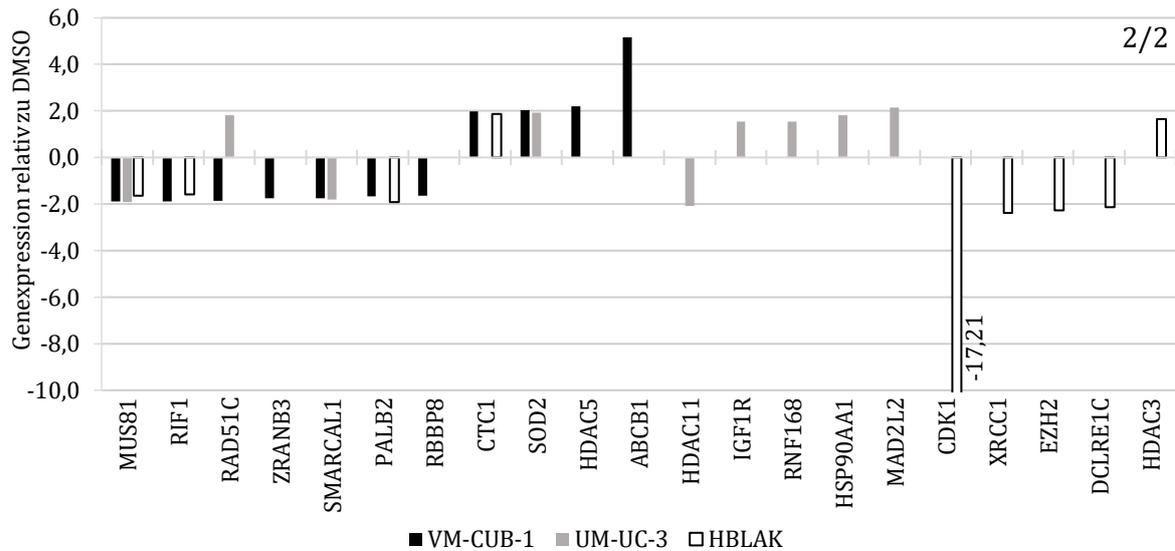


Abb. 38: Expression PARP-assoziierter Gene nach PLX-Behandlung in den UCCs VM-CUB1 und UM-UC-3, sowie in der Kontrolllinie HBLAK. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen relativ zur jeweiligen DMSO-Kontrolle. Auf der x-Achse sind die einzelnen Gene aufgetragen, auf der y-Achse ist der *fold change* (FC) der Genexpression nach PLX-Behandlung relativ zur DMSO-Kontrolle dargestellt. Die x-Achse wurde zur besseren Übersicht auf zwei Graphen aufgeteilt. Die y-Achsen wurden zur besseren Anschauung bei -10 beendet. Bei Überschreiten der Skala sind die wahren Werte neben/über den Balken aufgeführt.

Zunächst fiel bei der Auswertung auf, dass mehr Gene vermindert exprimiert waren als induziert wurden. Wie auch bei den unbehandelten Zelllinien war auch nach der Behandlung mit PLX keine Veränderung in den *PARP1/PARP2*-Genen festzustellen. Eine Veränderung des tatsächlichen Angriffsziels des PARPi durch PLX gab es also nicht. Wie bereits bei den unbehandelten UCCs war aber auch nach der Behandlung mit PLX eine Veränderung der *ABC*-Genexpression zu sehen. Zahlreiche andere Gene wurden durch den BETi in ihrer Expression stark vermindert. Es zeigt sich also, dass es durch die Behandlung mit PLX zu einer Vielzahl von Expressionsveränderungen PARP-assoziierter Gene in den UCCs kommt. Dadurch ergeben sich mögliche Ansätze einer Erklärung der synergistischen Wirkung von BETi und PARPi. Welche konkreten Genveränderungen den hier gezeigten Synergismus schlussendlich bedingen bedarf zum aktuellen Zeitpunkt weiteren Untersuchungen.

5 Diskussion

5.1 Wirksamkeit der PARPi-Monotherapie

Ziel dieser Arbeit war es, neue therapeutische Optionen für Patienten mit einem fortgeschrittenen muskelinvasiven Harnblasenkarzinom zu erforschen. Es ist bekannt, dass die meisten dieser Patienten im Verlauf der Behandlung eine Resistenz gegen die aktuell vorherrschende Therapie mit Cisplatin entwickeln. Das Hauptaugenmerk lag daher auf der Untersuchung Cisplatin-resistenter UC-Zelllinien. In Vorarbeiten durch Skowron et al. (2018) konnte eine Vielzahl an Mechanismen identifiziert werden, die zur Resistenzentwicklung der Karzinomzellen gegenüber Cisplatin beitragen könnten. Besonders eindrücklich zeigte sich dabei die Fähigkeit der Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien bereits gemessene DSBs im Verlauf der Zeit wieder zu reduzieren. Es konnten Hinweise darauf gesammelt werden, dass Cisplatin-resistente UCCs in der Lage sind, ihre DNA-Reparaturwege zu verbessern, um somit auch hohe Dosen des Chemotherapeutikums zu erdulden. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit Kombinationstherapien mit Substanzen untersucht, die in der Lage sind, die DNA-Reparaturmechanismen von Zellen zu inhibieren. Als Inhibitoren der DNA-Reparatur werden aktuell in zahlreichen Studien PARPi untersucht. Präklinische Studien haben beispielsweise zeigen können, dass die Anwendung eines PARPi in Kombination mit Cisplatin mehr DNA-Schäden bewirken kann als die alleinige Therapie mit Cisplatin (Jian et al., 2014, Bhattacharjee et al., 2022). PARPi führen vor allem zu einer Defizienz des alternativen NHEJ-Weges und machen die Zellen somit abhängig vom HR-Reparaturweg. Bei einigen BRCA-mutierten und somit HR-defizienten Tumorentitäten finden PARPi daher bereits klinische Anwendung und machen sie für weitere Forschungsarbeiten besonders interessant (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021b, European Medicines Agency, 2024a). Aus aktuellen Studien ist außerdem bekannt, dass PARPi in weiteren BRCA-mutierten Tumoren, für die PARPi bisher noch nicht zugelassen sind, zu vielversprechenden Ergebnissen geführt haben (Lord and Ashworth, 2016, Murai et al., 2012).

5.1.1 Ansprechen von UCCs und LTTs auf die PARPi-Monotherapie

Die Wirkung von PARPi auf UCCs ist wenig untersucht. Da das UC meist keine HR-Defizienz aufweist, war davon auszugehen, dass eine Monotherapie mit einem PARPi nicht effektiv sein würde und somit eine Kombinationstherapie erforderlich macht. Anhand der durchgeführten MTT-Tests nach alleiniger Olaparib-Behandlung konnte im Zuge dieser Arbeit belegt werden, dass die parentalen UCCs wenig sensitiv gegenüber der Monotherapie waren. Dies deckt sich auch mit Untersuchungen, die in einer Studie von Bhattacharjee et al. (2022) dargestellt werden. Auch hier wurden Blasenkarzinomzelllinien unter anderem mit Olaparib behandelt, wobei sich kein relevanter Effekt auf die Karzinomzellen in der Monotherapie zeigte. Die in

der hier vorliegenden Arbeit gemessenen IC_{50} -Werte der getesteten UC-Zelllinien bewegten sich im Bereich zwischen 11,0 μM und 97,2 μM . Vor allem die Zelllinie RT-112 zeigte sich besonders resistent gegenüber Olaparib. Vergleicht man diese Werte mit anderen Arbeiten, die sich mit der Wirksamkeit von Olaparib auf andere nicht BRCA-mutierte Karzinomzellen beschäftigt haben, so zeigt sich, dass die IC_{50} -Werte der parentalen UCCs im direkten Vergleich wesentlich höher liegen. So wurde z.B. durch Karakashev et al. (2017) bei der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR3 (BRCA-Wildtyp) ein Olaparib IC_{50} von 5,0 μM gemessen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten LTTs zeigte sich, dass alle Cisplatin-resistenten Sublinien sensitiver auf die Monotherapie mit Olaparib reagierten als die parentalen UCCs. Dies führt zu der theoretischen Annahme, dass Cisplatin-resistente Zellen durch ihr hohes Maß an DNA-Schädigung verstärkt auf die verschiedenen DNA-Reparaturwege und somit auch auf den NHEJ-Reparaturweg angewiesen sein könnten. Eine Kombinationstherapie könnte als vor allem bei diesen Zellen erfolgsversprechend sein.

Zur Validierung der Wirksamkeit der Substanzgruppe der PARPi wurde im Zuge dieser Arbeit neben Olaparib auch der PARPi Talazoparib untersucht. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Monoanwendung von Talazoparib auf die UC-Zelllinie UM-UC-3 keinen starken zytotoxischen Effekt hatte (Thy et al., 2021). Es zeigte sich eine hohe Substanztoleranz in der Monotherapie, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit war außerdem, ähnlich wie bei der Monotherapie mit Olaparib, auch bei der Talazoparib-Monotherapie eine hohe Spannbreite der IC_{50} -Werte in den unterschiedlichen Zelllinien festgestellt worden. RT-112 war auch hier die resistenteste parentale Zelllinie, RT-112 LTT wiederum zeigte sich bei der Monotherapie mit Talazoparib allerdings noch resistenter als die parentale Zelllinie. Insgesamt lagen die IC_{50} -Werte von Talazoparib aber deutlich unterhalb der Werte für Olaparib, was möglicherweise eher für die Verwendung von Talazoparib sprechen könnte. Ein positives Argument für Talazoparib ergab sich vor allem auch aus dem IC_{50} -Wert für die Kontrollzelllinie HBLAK, da dieser höher lag als die IC_{50} -Werte der meisten UC-Zelllinien und auch höher als die Werte der zwei LTT-Zelllinien T24 LTT und J82LTT. Diese Beobachtung könnte also einen positiven Effekt auf die Nebentoxizität haben bei der Verwendung von Talazoparib im Gegensatz zu Olaparib. Im Gegensatz zu Talazoparib befindet sich Olaparib allerdings bereits seit ca. 10 Jahren in vermehrter klinischer Anwendung bei der Behandlung HR-defizienter Tumorentitäten was einen enormen Vorteil mit Blick auf vorliegende klinische Langzeitdaten bietet. Eine klinische Zulassung in der EU liegt allerdings für beide Substanzen vor (European Medicines Agency, 2024a, European Medicines Agency, 2024b). Insgesamt konnten für beide hier untersuchten PARPi sowohl Vor- als auch Nachteile aufgezeigt werden, die die Frage nach dem idealen PARPi aktuell noch offenlässt.

5.1.2 Analyse möglicher Faktoren, die das Ansprechen auf PARPi beeinflussen

Anhand der RNAseq-Datenauswertung konnten Einblicke in die Genexpression der unterschiedlichen UCCs, sowie ihre Cisplatin-resistenten Sublinien gewonnen werden, die Rückschlüsse auf mögliche Resistenzmechanismen gegenüber der Substanzklasse der PARPi zulassen. Dabei lag das Augenmerk vor allem auf der Zelllinie RT-112, die sich gegenüber Olaparib und Talazoparib am resistantesten gezeigt hatte. Zunächst fiel bei der Analyse der Transkriptomdaten auf, dass bei den parental UCCs die beiden Gene *PARP1* und *PARP2*, die für die Expression der PARPi Zielproteine verantwortlich sind, im Vergleich zu normalen Zellen nicht differentiell exprimiert waren. Auf Basis der in diesem Projekt vorliegenden Daten ist also nicht von einem Resistenzmechanismus durch einen Verlust des Zielproteins auszugehen.

Ein auffällig differentiell exprimiertes Gen, was im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf PARPi in der Literatur Erwähnung findet, ist das Gen *SLFN11*. Es wird beschrieben, dass der Verlust von *SLFN11* zu einer Resistenz gegenüber PARPi führen kann. *SLFN11* ist als „Wächter des Genoms“ dafür zuständig, Zellen mit einer defekten Replikationsfähigkeit in einen S-Phasen-Arrest zu führen und im Falle einer irreversiblen Schädigung in Apoptose zu treiben (Noordermeer and van Attikum, 2019, Murai et al., 2018). Entsprechend verhindert ein starker Expressionsverlust von *SLFN11*, den wir in der RT-112 Zelllinie nachweisen konnten, dass diese Zellen in die Apoptose getrieben werden können und könnte zur beobachteten Resistenz gegenüber PARPi beitragen.

Aus der Literatur geht auch hervor, dass der Verlust des so genannten TP53BP1-REV7-Shieldin-Komplexes ein vermindertes Ansprechen von Tumorzellen auf die Behandlung mit PARPi bewirken kann. (Noordermeer and van Attikum, 2019). Es ist bekannt, dass der Shieldin-Komplex im Falle eines DNA-DSB zu einer Verschiebung des Reparaturmechanismus von der HR- zur NHEJ-Reparatur führt. Ein aktiver Shieldin-Komplex bewirkt in der Zelle also, dass die HR-Reparatur herunterreguliert und der NHEJ-Reparaturweg verstärkt genutzt wird. (Gupta et al., 2018). Zwei wichtige Gene für die Funktionalität des Shieldin-Komplexes sind die Gene *RIF1* und *REV7* (= *MAD2L2*). Beide Gene interagieren stark mit dem *TP53BP1*-Gen, welches Teil des Shieldin-Komplexes ist und gemeinsam mit *RIF1* und *REV7* den NHEJ-Reparaturweg fördert (Gupta et al., 2018, Escibano-Díaz et al., 2013). Mit Hilfe der RNAseq-Datenauswertung konnte gezeigt werden, dass *MAD2L2* in RT-112 Zellen und in VM-CUB1 herunterreguliert war. Ein solcher Expressionsverlust könnte bedeuten, dass der Shieldin-Komplex nicht funktional ist und dadurch ein Ansprechen auf PARPi reduziert ist.

Auch *WRN* war in der Zelllinie RT-112 herunterreguliert. Das WRN-Protein spielt unter anderem eine Rolle in der Reparatur von DNA-DSBs. Das Protein interagiert mit anderen Proteinen, die für die verschiedenen DNA-Reparaturwege notwendig sind, unter anderem auch den HR- und den NHEJ-Reparaturweg (Lachapelle et al., 2011, Oshima et al., 2002). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass ein *Knockdown* des WRN-Proteins zu einer Reduktion des klassischen NHEJ-Weges führt (Shamanna et al., 2016). Dies könnte eine weitere mögliche Erklärung dafür sein, wieso RT-112 nur schlecht auf die Monotherapie mit PARPi anspricht.

Das *PTEN*-Gen war durch eine deutlich verminderte Expression in UM-UC-3 aufgefallen. Die Untersuchung von UM-UC-3 war in diesem Zusammenhang von großem Interesse, da diese zu den Zelllinie gehörte, die eher sensitiv auf die Behandlung mit Olaparib reagierte. *PTEN* ist ein Tumorsuppressorgen, welches in vielen Tumorentitäten verloren geht. Es spielt eine Rolle bei der Reparatur von DNA-DSBs via HR (Mansour et al., 2018). Studien haben zeigen können, dass ein Verlust des *PTEN*-Gens dazu führen kann, dass es zu einem Defekt in der HR kommt und die Zelle somit vermehrt auf die Reparatur über den NHEJ-Reparaturweg angewiesen ist. Aufgrund dieser Verschiebung der Reparatur hin zum alternativen NHEJ-Weg reagieren die Tumorzellen besser auf PARPi. Ein Verlust von *PTEN* machte die Zellen also sensitiver gegenüber der Behandlung (Dedes et al., 2010, Mansour et al., 2018, Mendes-Pereira et al., 2009). Dies könnte dazu beitragen, dass UM-UC-3 mit einem IC_{50} von 11,0 μ M für Olaparib zu den eher sensitiven Zelllinien zählt.

Zusätzlich dazu konnte bei UM-UC-3 auch eine starke Reduktion des *ABCG2* festgestellt werden (FC = -127,8). *ABC*-Gene kodieren für so genannte ABC-Transporter Proteine. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegen Medikamente. Kommt es zu einer Überexpression der *ABC*-Gene, so können mithilfe der daraus überexprimierten ABC-Proteine verstärkt Transporter in die Zellwand eingebaut werden. Diese führen zu einem verstärkten Drug-Efflux, also dem Abtransport der Substanz aus der Zelle heraus. Bei Tumoren, die in Studien eine Resistenz gegen PARPi gezeigt hatten, konnte in den meisten Fällen eine Überexpression der Transporter-Gene festgestellt werden (Noordermeer and van Attikum, 2019). Der Verlust des Transport-Gens *ABCG2* könnte also dazu führen, dass die Zelle die Substanz aufnimmt und nur verminderte Möglichkeiten hat, die toxische Substanz wieder aus der Zelle heraus zu befördern. Man spricht von einem verminderten Drug-Efflux. Es kommt zu einer Akkumulation des PARPi innerhalb der Zelle und folglich zum Zelltod. Umgekehrt konnte in den eher resistenten Zelllinien keine Mutation im *ABC*-Gen festgestellt werden, so dass hier von einem funktionierenden Drug-Efflux auszugehen ist.

Nicht nur unter den parental UCCs konnten deutliche Unterschiede im Ansprechen auf die Behandlung mit PARPi nachgewiesen werden, sondern auch zwischen den

Cisplatin-sensitiven und den -resistenten Zelllinien. In der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalyse konnten Unterschiede zwischen parentalen und LTT-Zelllinien identifiziert werden, die einen Anhaltspunkt liefern könnten für die zugrundeliegenden Mechanismen des unterschiedlichen PARPi-Ansprechens. Ein auffällig dereguliertes Gen war *MRE11*. *MRE11* ist Teil des so genannten MRN-Komplexes, welcher eine zentrale Rolle in der Reparatur von DNA-DSBs spielt. Der Komplex bindet an den DNA-DSB und führt zu einer Aktivierung der ATM-Kinase. Es kommt zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch die HR (Brown et al., 2017, Krajewska et al., 2015). *MRE11* war in den Cisplatin-resistenten T24 LTT in Relation zur parentalen Zelllinie herunterreguliert, so dass es zu einer Verschiebung hin zum NHEJ-Reparaturweg gekommen sein könnte. Dies wiederum könnte eine mögliche Erklärung für das bessere Ansprechen der LTTs auf die Monotherapie mit dem PARPi darstellen.

Die Gene *SMARCAL1* und *EZH2* sind an der Stabilität der Replikationsgabeln beteiligt. *SMARCAL1* war in T-24 LTT überexprimiert, *EZH2* zeigte in RT-112 LTT eine Überexpression. Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Verlust dieser Gene zu einer PARPi-Resistenz beitragen kann (Noordermeer and van Attikum, 2019, Rose et al., 2020). Somit kann umgekehrt davon ausgegangen werden, dass es bei den Cisplatin-resistenten LTTs durch die Überexpression dieser Gene zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber PARPi kommen könnte. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass einige Gene, die im Zusammenhang mit der Stabilität der Replikationsgabel stehen zu einer erhöhten Sensitivität von LTT-Zellen gegenüber PARPi beitragen könnten.

Darüber hinaus fielen bei der Analyse der RNAseq-Daten vor allem die teils starken Reduktionen der ABC-Gene *ABCB1* und *ABCG2* in drei LTT-Zelllinien im Vergleich zu ihren parentalen Gegenstücken auf. Bei einer verminderten ABC-Genexpression ist davon auszugehen, dass die zytotoxische Substanz in der Zelle verbleibt und dort verstärkt wirken kann. Da in allen drei gemessenen LTTs eine verminderte ABC-Genexpression zu beobachten war, könnte dies einen Hinweis darauf liefern, wieso die LTTs sensibler auf die Monotherapie mit PARPi reagieren als ihre parentalen Gegenstücke.

In dem zuvor dargestellten Vergleich der resistentesten Zelllinie RT-112 mit den anderen weniger resistenten Zelllinien fiel vor allem die starke Herunterregulierung der Gene *MAD2L2* und *WRN* auf, die für den Aufbau des Shieldin-Komplexes benötigt werden. Durch die Minderexpression in RT-112 könnte ein möglicher Resistenzmechanismus gegen PARPi begründet werden. Bei den vorliegenden RNAseq-Daten zu den Genveränderungen in den LTTs fällt auf, dass genau diese Gene in RT-112 LTT im Vergleich zu der parentalen Zelllinie hochreguliert sind. Dies könnte dazu führen, dass der Shieldin-Komplex in der LTT-Zelllinie

wieder stärker aufgebaut werden kann und PARPi durch die dadurch entstehende Verschiebung der DSB-Reparatur zum NHEJ-Weg eine stärkere Wirkung zeigen können.

Erwähnenswert ist darüber hinaus, dass bei der Cisplatin-resistenten Zelllinie J82 LTT eine Überexpression des *PARP1*-Gens festgestellt werden konnte und dadurch eventuell ein stärkeres Ansprechen bewirkt werden könnte.

Auch in anderen Arbeiten konnten bereits Faktoren identifiziert werden, die mögliche Rückschlüsse auf das Ansprechen der unterschiedlichen Zelllinien auf eine Behandlung mit PARPi zulassen. Skowron et al. (2018) konnten beispielsweise nachweisen, dass im Vergleich zur parentalen T24-Zelllinie eine starke Überexpression des DNA-Reparaturgens *ERCC2* in der Zelllinie T24 LTT zu finden war, wodurch es zu einer Verbesserung der DNA-Reparatur gekommen sein könnte. Auch genetische Veränderungen durch Mutationen spielen bei der Frage nach dem PARPi-Ansprechen eine große Rolle und sind Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. In einer Studie aus dem Jahre 2019 konnte Rampias et al. (2019) nachweisen, dass der epigenetische Regulator *KMT2C/MLL3* in vielen neoplastischen Geweben herunterreguliert ist – auch in Zellen des Urothelkarzinoms. Bei *KMT2C/MLL3* handelt es sich um eine Histonmethyltransferase, die an der Regulation der DNA-Reparatur beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust oder die Reduktion des Gens zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber dem PARPi Olaparib führt (Rampias et al., 2019). Von den hier verwendeten Zelllinien tragen J82 und RT-112 eine Missense-Mutation im *KMT2C*-Gen (Abfrage www.cbioportal.org). Mit Blick auf die eigenen erstellten Dosiswirkungskurven scheinen diese Mutationen in den genannten Zelllinien aber nicht zu einem sensitiveren Ansprechen auf Olaparib zu führen. Vor allem RT-112 zeigte sich trotz der Missense-Mutation im *KMT2C*-Gen am resistentesten gegenüber Olaparib.

Interessanterweise geht aus der cBioportal Datenbank auch hervor, dass es bei den Zelllinien 253J und J82 Missense-Mutationen im *BRCA1*-Gen gibt. Bei 253J kommt es aufgrund dieser Mutation zu einer Veränderung im Protein p.V1687F, bei J82 zeigt sich die Veränderung im Protein p.S114T. Laut Ruffner et al. (2001) handelt es sich bei ca. 36% aller *BRCA1*-Mutationen um Missense-Mutationen. Bei den restlichen Mutationen handelt es sich um Nonsense- und Frame-Shift-Mutationen, die zu einer Verkürzung der betroffenen Proteine führen und somit potenziell kanzerogen sind. Bei der Missense-Mutation ist das tatsächliche funktionelle Ausmaß in der Regel nicht feststellbar (Kais et al., 2012). Hält man an der Theorie fest, dass eine *BRCA*-Mutation, die einen funktionellen Einfluss auf die HR-Reparatur hat, zu einem besseren Ansprechen auf PARPi führt, so kann man aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit davon ausgehen, dass die *BRCA*-Missense-Mutationen in den Zelllinien 253J und J82 keine funktionelle Bedeutung für die HR-Reparatur haben. Mit einem IC_{50} -Wert von 51,6 μ M für 253J und 52,7 μ M für J82 liegen die beiden Zelllinien im Mittelfeld

der getesteten Zelllinien oder sprechen sogar eher schlechter an als andere Zelllinien. Eine weitere Analyse und Beachtung der vorliegenden BRCA-Mutationen fanden daher im Zuge dieser Arbeit nicht statt. Demzufolge wurden nachfolgend Ansätze verfolgt, in denen eine *BRCAness* in wildtypischen UCCs künstlich induziert wurde. Dies wurde durch die Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren wie HDACi und BETi umgesetzt, für die in Vorarbeiten bereits eine expressionsinhibierende Wirkung auf Faktoren der HR-Reparatur gezeigt worden war.

Zunächst aber wurde die Kombination aus dem PARPi Olaparib und dem aktuellen Goldstandard Cisplatin untersucht. Skowron et al. (2018) hatten gezeigt, dass in Cisplatin-resistenten Zelllinien weniger DNA-Schaden nachgewiesen werden kann, was die Theorie der verbesserten DNA-Reparaturmaschinerie in den LTTs unterstützt. Die Kombination aus einer DNA-schädigenden Substanz wie Cisplatin mit einer Substanz wie Olaparib, die Einfluss auf die DNA-Reparaturmaschinerie haben kann, könnte also gute zytotoxische Effekte zeigen.

5.2 Wirksamkeit von Kombinationstherapien mit PARPi

5.2.1 Ansprechen der UCCs und LTTs auf die Kombination aus PARPi und Cisplatin

Die Ergebnisse der Chou-Talalay Synergieanalyse ergaben für die kombinierte, simultane Behandlung mit Olaparib und Cisplatin keine wesentlichen Synergieeffekte. Lediglich bei den parentalen Zelllinien wurden vereinzelt synergistische Effekte beobachtet. Dies deckt sich auch mit Beobachtungen, die durch Bhattacharjee et al. (2022) gemacht werden konnten. Hier wurde gezeigt, dass die Kombinationstherapie aus Cisplatin mit unterschiedlichen PARPi (Niraparib, Olaparib, Rucaparib, Talazoparib, und Veliparib) in den beiden getesteten UC-Zelllinien UM-UC-3 und T24 zu einem geringeren prozentualen Zellüberleben im Vergleich zur DMSO-Kontrolle geführt hat als die jeweilige Monotherapie. Cisplatin-resistente Zelllinien wurden in dieser Studie aber nicht untersucht. Bei den im Zuge dieser Arbeit getesteten LTTs konnte lediglich bei der Zelllinie J82 LTT ein Synergismus aus Cisplatin und Olaparib in den hohen Dosierungen festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen noch einmal die Annahme, dass Cisplatin-resistente LTT-Zelllinien über eine verbesserte DNA-Reparaturmaschinerie verfügen, die in der Lage ist, Schäden durch Cisplatin sowie eventuell auch anderer Substanzen effektiv zu beheben oder zu umgehen. Es ist davon auszugehen, dass es durch die Kombination aus dem PARPi Olaparib und Cisplatin zu vermehrten DNA-Schäden kam, die aber aufgrund der weiterhin intakten HR-Reparatur vor allem durch die LTTs effektiv behoben werden konnten. Ein synergistischer Effekt konnte somit nicht erzielt werden.

In der Literatur findet man Daten einer klinischen Phase 1 Studie zur Kombination von Olaparib mit Cisplatin bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren. Für Tumore mit *BRCA1/BRCA2*-Mutation wurde ein gutes Ansprechen beobachtet. Allerdings zeigte die Studie auch starke Nebenwirkungen bei gleichzeitiger Gabe der beiden Substanzen. (Balmaña et al., 2014). Ähnlich schwere Nebenwirkungen wurden in einer kleinen Kohorte von Patienten mit Pankreaskarzinomen beobachtet (Yarchoan et al., 2017). Daten aus Zelllinien von Zervixkarzinomen ergaben, dass in diesen eine hohe *PARP1*-Expression nachweisbar war, die nach Behandlung mit Cisplatin weiter gesteigert wurde. Die Behandlung mit Olaparib wirkte deutlich inhibierend auf die Proliferation und die Klonogenität der Zellen und verstärkte die Zelltodinduktion nach Kombination mit Cisplatin (Prasad et al., 2017). Die eigene Auswertung der Transkriptomdaten ergab für die hier untersuchten UCCs keine erhöhte Expression von *PARP1/PARP2* im Vergleich zur normalen Kontrollzelllinie HBLAK. Eine Induktion in Cisplatin behandelten UCCs konnte für *PARP1* nur in J82 LTT festgestellt werden, die sich aber bezüglich ihres IC_{50} Wertes nicht von T24-Zellen (ohne PARP-Veränderungen) und auch nicht im Ansprechen auf die Kombination von anderen Ziellinien unterscheidet. Dieser Mechanismus scheint in UCCs weniger relevant zu sein. Aus diesen Erkenntnissen leitete sich ab, dass eine pharmakologische Blockade des HR-Reparaturweges eine sinnvolle Kombination mit einem PARPi darstellen könnte.

5.2.2 Ansprechen der UCCs und LTTs auf die Kombination aus PARPi und HDACi

Im Fokus aktueller Projekte der Arbeitsgruppe stehen die Erforschung epigenetischer Veränderungen und ihr Einfluss auf die Karzinogenese, sowie die therapeutische Anwendung epigenetischer Inhibitoren (Schulz et al., 2015, Niegisch et al., 2015, Meneceur et al., 2023). Dabei hat man zeigen können, dass pharmakologische Inhibitoren von epigenetischen Enzymen, wie den HDACs, sowohl eine kanonische epigenetische Wirkung haben als auch DNA-schädigend wirken können (Pinkerneil et al., 2017). Durch die Inhibition der HDACs kommt es zu Veränderungen der Genexpression und folglich zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose (National Cancer Institute, 2021). Darüber hinaus sind auch Effekte auf Komponenten der DNA-Reparaturmaschinerie bekannt, die die Gruppe der HDACi für dieses Projekt besonders interessant machte (Pinkerneil et al., 2017). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde vor allem der HDAC Klasse I-spezifische Inhibitor Romidepsin charakterisiert und als Kombinationspartner mit anderen Substanzen verwendet – mit teils vielversprechenden Resultaten. Epigenetische Inhibitoren können offenbar DNA-Schäden induzieren, zeitgleich aber auch durch induzierte Genexpressionsveränderungen künstlich zu einer Reparatur-Defizienz z.B. der HR-Reparatur führen. Somit könnten epigenetische Inhibitoren behandelte Zellen gegenüber PARPi sensitivieren.

Marijon et al. (2018) konnte in einer Studie zur Behandlung des TNBC nachweisen, dass die Kombination eines HDACi mit dem PARPi Olaparib auch bei BRCA-Wildtyp Karzinomzellen zu einer effektiven Induktion der Apoptose führen kann. Hierbei beruhte die Apoptoseinduktion vornehmlich auf DNA-Schäden, die dann zum Zellzyklusarrest und folglich zum programmierten Zelltod führten. Bei BRCA-mutierten Zellen konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass es zu einer Reduktion der Expression von Proteinen kam, die für eine funktionierende HR-Reparatur benötigt werden. Auch in Studien zu hämatologischen Krebserkrankungen konnten bereits synergistische Effekte einer Kombinationsbehandlung aus HDACi und PARPi dargestellt werden (Valdez et al., 2022). Auch hier konnte ein direkter Effekt auf die Synthese und Funktion von Proteinen festgestellt werden, die an einer funktionierenden DNA-Reparatur beteiligt sind. Ramos et al. (2023) konnte in einer aktuellen Studie nachweisen, dass das Konzept der Kombinationsbehandlung aus HDACi und PARPi auch bei der Behandlung des Ewing-Sarkoms mit einer funktionierenden HR-Reparatur zu vielversprechenden Ergebnissen geführt hat. Da die in dieser Arbeit verwendeten UC-Zelllinien ebenfalls keine bekannte HR-Defizienz z.B. durch eine BRCA-Mutation aufweisen, sollte der Effekt einer Kombination aus dem HDACi Romidepsin mit dem PARPi Olaparib untersucht werden.

Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung aus Romidepsin und Olaparib haben gezeigt, dass es bei den parental Zelllinien einen synergistischen Effekt der beiden Substanzen gab. Diese Ergebnisse decken sich also mit den oben beschriebenen Studienergebnissen anderer Forschungsgruppen. Dieser Effekt blieb bei den Cisplatin-resistenten Zelllinien allerdings weitestgehend aus und war nur bei sehr hohen Dosierungen zu erkennen. Wie bereits bei der Kombination des PARPi Olaparib mit Cisplatin könnte die verbesserte DNA-Reparaturkompetenz in Cisplatin-resistenten Zelllinien dazu führen, dass LTTs trotz der kombinierten Behandlung aus Olaparib und Romidepsin weiterhin in der Lage sind, DNA-Schäden zu beheben. Darüber hinaus könnten die durch die LTTs entwickelten Resistenzmechanismen gegen Cisplatin ebenfalls zu einer verbesserten Abwehr gegen die Kombinationsbehandlung führen (Skowron et al., 2018).

In einer Studie zur Wirksamkeit des kombinierten HDAC/BET-Inhibitors TW9 in Kombination mit dem Zytostatikum Gemcitabine zur Behandlung des Pankreaskarzinoms hat nicht nur die kombinierte Behandlung der beiden Substanzen zu vielversprechenden Ergebnissen geführt, sondern vor allem auch die sequenzielle Verabreichung (Zhang et al., 2020). Basierend auf diesen Studienergebnissen hat unsere Arbeitsgruppe in Vorarbeiten ebenfalls sequenzielle Behandlungsschemata mit diversen Kombinationspartnern an UCCs erprobt – mit ernüchternden Ergebnissen. Weder der HDACi Romidepsin noch andere epigenetische Inhibitoren konnten zusätzliche synergistische Effekte durch eine sequenzielle

Behandlung mit anderen Substanzen, wie z.B. Cisplatin, erzielen. Vielmehr kam es in den UCCs durch die zeitversetzte Gabe zu Verschlechterungen der synergistischen Effekte oder zu einer vermehrten Nebentoxizität (Thy et al., 2021). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zunächst keine weiteren sequenziellen Versuche mit Romidepsin durchgeführt und der HDACi im Zuge dieses Projektes nicht weiter untersucht.

5.2.3 Ansprechen der UCCs und LTTs auf die Kombination aus PARPi und BETi

Vorliegende Studien, die sich mit der Aktivität und Funktion von BET-Proteinen, vor allem BRD4 beschäftigt haben, ergaben, dass BRD4-Proteine neben der bekannten kanonischen Funktion bei der Gentranskription auch einen Einfluss auf die DNA-Schadensantwort und die DNA-Reparatur haben (Donati et al., 2018). Mio et al. (2019) konnten außerdem nachweisen, dass es einen direkten Zusammenhang gibt zwischen der pharmakologischen Inhibition des BRD4-Proteins und einer reduzierten Expression der HR-Komponenten BRCA1 und RAD51. Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass durch die Behandlung mit BETi eine künstliche *BRCAness* herbeigeführt werden könnte, die in Kombination mit Substanzen, die den NHEJ-Reparaturweg blockieren, zu synergistischen Effekten bei der Behandlung von nicht-HR-defizienten Tumoren führen könnten. In dieser Arbeit wurde vornehmlich die Wirkung des PARPi Olaparib in Kombination mit dem BETi PLX auf Cisplatin-sensitive und -resistente UCCs untersucht. Dafür wurden zunächst für die vier parentalen UCCs und ihre Cisplatin-resistenten Sublinien die IC_{50} -Werte für PLX bestimmt. Wie bereits bei der IC_{50} -Bestimmung für Olaparib fiel dabei die große Spannbreite der Werte auf: Während sich die parentalen Zelllinien RT-112, T24 und 253J bei IC_{50} -Werten zwischen 2,14 μ M und 3,19 μ M bewegten, war die vierte parentale Zelllinie J82 deutlich resistenter gegenüber der Monotherapie mit PLX. Ähnliche Unterschiede hatten sich auch in einer früheren Arbeit zwischen den UCCs VM-CUB1 und UM-UC-3 ergeben, wobei letztere durch eine deutlich reduzierte Sensitivität gegenüber PLX auffiel ($IC_{50} = 8,8 \mu$ M) (Thy et al., 2021). Diese große Varianz im Ansprechen der UCCs auf die Monotherapie konnte auch in Arbeiten mit anderen BETi bereits festgestellt werden. Hölscher et al. (2018) beschrieben bei der Behandlung verschiedener UCCs mit dem BETi JQ1 eine IC_{50} -Varianz zwischen 0,18 μ M und 10 μ M. Wodurch diese große Spannbreite zwischen den UCCs bedingt ist und welche molekularen Faktoren daran beteiligt sind ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Die Cisplatin-resistenten LTTs zeigten eine IC_{50} -Spannbreite von 0,8 μ M bis 3,1 μ M. Es fiel auf, dass die IC_{50} -Werte der LTT-Zelllinien in allen vier Fällen deutlich unter den Werten der parentalen UCCs lagen. Ähnliches konnte bereits bei den IC_{50} -Bestimmungen des PARPi Olaparib beobachtet werden. Die Kontrollzelllinie HBLAK zeigte sich im Gegensatz zu den gemessenen UCCs und LTTs sensitiver gegenüber der

Behandlung mit PLX, sodass von einer hohen Nebentoxizität bei der Monotherapie mit dem BETi auszugehen war.

Anders als bei den zuvor getesteten Kombinationen aus dem PARPi Olaparib mit Cisplatin oder dem HDACi Romidepsin konnte bei der Kombination aus Olaparib und PLX in allen acht Zelllinien ein synergistischer Effekt gezeigt werden, auch in den niedrigeren Dosisbereichen. Besonders bemerkenswert war das sensitive Ansprechen der Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien, die im Fokus dieses Projektes standen. Darüber hinaus war das besonders gute Ansprechen der Zelllinie J82 auf die Kombination aus Olaparib und PLX ein sehr interessanter Fund, da diese Zelllinie sich zuvor noch resistent gegenüber der PLX-Monotherapie gezeigt hatte. Einen vergleichbaren Befund hatte unsere Arbeitsgruppe bereits bei der Zelllinie UM-UC-3 gemacht. Diese hatte sich bei der Monotherapie ebenfalls sehr resistent gegenüber PLX gezeigt, in der Kombination mit dem PARPi Talazoparib allerdings sehr gute Ergebnisse erzielt (Thy et al., 2021). Dies unterstreicht noch einmal die hohe Relevanz der Kombinationstherapie, da auch bei den Zelllinien, die zuvor resistent gegen die Monotherapie waren, eine effektive Zytotoxizität nachgewiesen werden konnte. Das vollständige Versagen der Monotherapie lässt also keine Rückschlüsse auf die Effektivität der Kombinationsbehandlung ziehen.

Aufbauend auf der synergistischen Wirkung der beiden Substanzen wurde im Anschluss an die Synergieanalyse für die Zelllinien RT-112 und T24 sowie die jeweiligen LTT-Sublinien RT-112 LTT und T24 LTT eine große Matrix mit unterschiedlichen Substanzdosierungen angefertigt, die mögliche Dosisreduzierungen bei gleichbleibendem zytotoxischem Effekt auf die Karzinomzellen darstellen sollte. Auch hier zeigten sich erneut die synergistischen Effekte der Kombinationstherapie, sodass in allen vier Zelllinien eine Dosisreduktion von $0,75 \times IC_{50}$ Olaparib und eine Reduzierung von $0,25 \times IC_{50}$ PLX für RT-112, T24 und RT-112 LTT, bzw. $0,5 \times IC_{50}$ PLX für T24 LTT festgelegt werden konnte. Ziel dieser Dosisreduktion war die Nebentoxizität der Behandlung zu reduzieren. Hierbei war vor allem die Dosisreduzierung von PLX durch die Kombinationsbehandlung als Erfolg zu werten. Studien mit BETi haben in der Vergangenheit im klinischen Kontext zeigen können, dass die Behandlung mit BETi zu multiplen Nebenwirkungen wie Müdigkeit und Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie, wie auch Durchfall und Übelkeit geführt hat, was einen Dosis-limitierenden Faktor darstellte (Amorim et al., 2016, Berthon et al., 2016).

Aufgrund der positiven Ergebnisse der Kombinationstherapie auf die Zellviabilität wurde auch der Effekt auf die Langzeitproliferation mittels Klonogenitätstest bestimmt. Dieser zeigte recht eindrucksvoll, dass die Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX trotz der reduzierten Dosierungen einen starken wachstumsreduzierenden Effekt auf die Zellen hatte. Dem gegenüber stand bei drei der vier getesteten Zelllinien der erfreulich schwache toxische

Effekt der Einzelbehandlung mit $0,25 \times IC_{50}$ PLX. Die Monobehandlung mit $0,75 \times IC_{50}$ Olaparib beeinträchtigte die Langzeitproliferationsfähigkeit stärker. Um den zugrundeliegenden Mechanismus genauer zu untersuchen wurde eine Zellzyklusanalyse, sowie ein Apoptosenachweis durchgeführt.

In der Zellzyklusanalyse konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Olaparib zu einer deutlichen Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase führte. Dieser Effekt war sowohl in den beiden parentalen als auch in den beiden Cisplatin-resistenten Sublinien zu beobachten. Auffällig war, dass vor allem die eigentlich sehr resistente Zelllinie RT-112 sowie ihre LTT-Sublinie einen stärkeren Effekt durch die Olaparib-Behandlung auf den Zellzyklus zeigte als T24 und T24 LTT. Darüber hinaus war zusätzlich bei RT-112 LTT ein deutlich stärkerer Effekt zu erkennen als bei der parentalen RT-112. Die Kombination aus Olaparib und PLX führte allerdings bei keiner der Zelllinien zu zusätzlichen Veränderungen im Zellzyklusprofil im Vergleich zur Monotherapie mit Olaparib. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass der PARPi Olaparib bereits allein dazu führt, dass die behandelten Zellen in einen Zellzyklusarrest geraten, um den Beginn der Mitose zu verhindern. In anderen Studien konnte bereits ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Brill et al. (2017) beschreiben bei der Behandlung von BRCA-Wildtyp high grade serösen Ovarialkarzinomen (HGSOC) ebenfalls eine Anreicherung der Zellen in der G2/M-Phase nach Olaparib Monotherapie. Aufbauend auf diesen Ergebnissen führten die Autoren Kombinationsbehandlungen mit dem PARPi Olaparib und dem CHK1-Inhibitor Prexasertib durch. CHK1 ist essenziell für die Aktivierung des G2/M-Checkpoints und somit ein Schlüsselregulator des Zellzyklus und des Zellüberlebens. Die Autoren konnten belegen, dass eine Kombination aus Olaparib mit Prexasertib zu einer Beschleunigung des Zellzyklus führte und defekte Zellen unkontrolliert in die Mitose-Phase und somit in Apoptose trieb. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Olaparib den Anstieg des Checkpoint-Inhibitors CHK1 bewirken könnte. Die Aktivierung von CHK1 durch Olaparib wurde auch in einer Untersuchung von Jelinic and Levine (2014) belegt. Durch Smith et al. (2020) konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit dem PARPi Rucaparib in BRCA-mutierten V-C8 Zellen, sowie BRCA-korrigierten V-C8.B2 Zellen zu einem Anstieg der Zellzyklusmarker ATR und CHK1 führte und folglich zu einer Aktivierung der Zellzyklus-Checkpoints und zum Arrest. Auch in Zervixkarzinomzellen wurde nach Olaparib-Behandlung eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase beobachtet (Prasad et al., 2017). Die Beteiligung der CHK1-Kinase am Olaparib-induzierten Zellzyklusarrest könnte auch erklären, warum in UCCs keine weiteren Veränderungen durch die Kombination mit dem BETi beobachtet wurden. Für PLX konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass diese Substanz zwar DNA-Schäden induziert, aber die Aktivierung der DNA-Reparaturantwort über ATM/ATR und CHK1 verhindert (Thy et al., 2021).

Die Analyse der Apoptoseinduktion mit Hilfe der Durchflusszytometrie hat bei drei der vier getesteten Zelllinien einen deutlich stärkeren apoptotischen Effekt bei der Kombinationstherapie aus Olaparib und PLX gezeigt als die Monotherapie der beiden Substanzen. Lediglich bei der parentalen UC-Zelllinie RT-112 bewirkte die Behandlung mit Olaparib plus PLX einen geringeren Anteil apoptotischer Zellen als die Monotherapie mit Olaparib. Bei allen vier Zelllinien zeigte die Einzelbehandlung mit Olaparib einen stärkeren Effekt als die Behandlung mit PLX allein. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der Behandlung der Zellen mit den angepassten verringerten Dosierungen gearbeitet wurde, die insbesondere für PLX erheblich reduziert waren. Zusätzlich zur Durchflusszytometrie wurde die Apoptose-Induktion auch durch ein verstärktes Ausmaß an PARP-Spaltung als Apoptosemarker im Western Blot nachgewiesen. Insgesamt konnte die Apoptoseanalyse nachweisen, dass zum einen die Behandlung mit Olaparib allein zu einer verstärkten Apoptose führt und dass dieser Effekt zum anderen durch die Kombinationsbehandlung mit PLX verstärkt wird.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die molekulare Wirkungsweise des BETi PLX als Monobehandlung ausgiebig charakterisiert. So wurde ein Anstieg der Caspase 3 und 7-Aktivität beschrieben. Gleichzeitig konnte eine Herunterregulierung des anti-apoptotischen Apoptoseregulators BCL2 nachgewiesen werden (Thy et al., 2021). Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführte Auswertung der RNAseq-Daten hat weitere Genexpressionsveränderungen durch die Behandlung der Zellen mit dem BETi PLX aufgedeckt. Anhand der Veränderungen der Genexpression nach PLX-Behandlung können Rückschlüsse gezogen werden auf mögliche Mechanismen, die die synergistische Wirkung des PARPi und des BETi erklären könnten.

Zuvor wurden mögliche genetische Faktoren und Genexpressionsveränderungen beschrieben, die das unterschiedliche Ansprechen der UCCs und LTTs auf die Monotherapie mit PARPi erklären könnten. Mit Hinblick auf die starken synergistischen Effekte zwischen BETi und PARPi liegt die Vermutung nahe, dass einige der dargestellten Resistenzmechanismen gegen PARPi durch die Behandlung mit PLX ausgeschaltet oder zumindest reduziert werden, so dass ein verbessertes Ansprechen auf PARPi die Folge ist. Daher wurden RNAseq-Daten von PLX-behandelten Zellen mit Hinblick auf die zuvor diskutierten Faktoren genauer untersucht.

Der Verlust des Shieldin-Komplexes aufgrund der Unterexpression der Gene *MAD2L2* und *WRN* wurde zuvor mit Blick auf mögliche Resistenzmechanismen diskutiert. In den Daten nach PLX-Behandlung ist eine Zunahme des *MAD2L2*-Gens in UM-UC-3 zu sehen. Darüber hinaus kommt es auch zu einer Zunahme der Expression des Gens *RNF168*, welches ebenfalls für die Rekrutierung des Shieldin-Komplexes benötigt wird (Gupta et al., 2018). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben zeigen können, dass vor allem die Zelllinie UM-UC-3 nur wenig auf

die Monotherapien mit PLX und PARPi angesprochen haben, die Kombination aus beiden Substanzen sich aber synergistisch zeigte (Thy et al., 2021). Auf Basis dieser Daten besteht also die Annahme, dass PLX dazu führen könnte, dass die Gene, die mit dem Shieldin-Komplex in Verbindung stehen, durch die Behandlung hochreguliert werden und somit dazu führen, dass im Falle eines DNA-DSB verstärkt auf den NHEJ-Reparaturweg gesetzt wird. Dies wiederum könnte bewirken, dass PARPi eine größere Angriffsfläche geboten wird, was zu einem sensibleren Ansprechen in Kombination mit PLX führen könnte.

Dem gegenüber steht das Gen *RIF1*, welches Teil des *MAD2L2*-Komplexes ist und in den Zelllinien VM-CUB1 und HBLAK nach PLX-Behandlung herunterreguliert wurde. Auch *RIF1* ist für die Rekrutierung des Shieldin-Komplexes notwendig und führt, im Falle eines DNA-DSB zu einer Verschiebung der Reparatur zum NHEJ-Weg und somit zu einem verstärkten PARPi-Ansprechen. Kommt es aber zu einer Herunterregulierung, wie es bei *RIF1* der Fall ist, so ist davon auszugehen, dass die Zellen weniger sensitiv auf die Behandlung mit PARPi ansprechen. Dies könnte zumindest einen Teil der Erklärung liefern, wieso bei VM-CUB1 und HBLAK ein nur schwacher bzw. gar kein synergistischer Effekt der Kombinationstherapie zu beobachten war.

In den vorangegangenen Ausführungen zum Thema Resistenzbildung gegenüber PARPi wurde auch der Resistenzmechanismus durch eine Überexpression der *ABC*-Transportergene diskutiert. Zur Erinnerung: Kommt es zur Überexpression der *ABC*-Gene und folglich zu mehr *ABC*-Transporterproteinen, so kann die Zelle die toxischen Substanzen besser aus der Zelle heraus befördern, es kommt also zu einer Resistenz. Umgekehrt ist bei einer Verminderung der *ABC*-Gene von einem besseren Ansprechen auszugehen. Dies konnte in dieser Arbeit als ein denkbarer Mechanismus identifiziert werden, warum LTT-Zellen sensitiver gegenüber PARPi waren. In den Auswertungen der PLX-behandelten Zellen fällt auf, dass es durch die Behandlung bei VM-CUB1 zu einer Verminderung des Gens *ABCG2*, sowie einem Anstieg des *ABCB1*-Gens kommt. Bei UM-UC-3 war jedoch keine Veränderung der *ABC*-Gene feststellbar. Auf Basis dieser Daten kann also nicht angenommen werden, dass PLX über eine Expressionsveränderung der *ABC*-Transportergene ein verbessertes PARPi-Ansprechen bewirkt. Interessanterweise konnte aber in der Kontrollzelllinie HBLAK ein Anstieg des *ABCG2*-Gens gemessen werden. Dies könnte einen Teil der Erklärung liefern, wieso in der benignen Urothelzelllinie kein synergistischer Effekt der Kombinationsbehandlung aus PARPi und PLX gemessen werden konnte. Durch die Behandlung mit PLX kommt es bei HBLAK also zu einem Expressionsanstieg der *ABC*-Gene, was wiederum dazu führen könnte, dass die Zelle verbesserte Mechanismen des Drug-Effluxes entwickelt und somit schlechter als die UCCs auf die Kombinationsbehandlung anspricht.

Bei der obenstehenden Analyse möglicher Faktoren, die die PARPi-Response beeinflussen könnten, wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Stabilität der Replikationsgabel und der erhöhten Sensitivität der LTT-Zelllinien gegenüber der Behandlung mit Olaparib dargestellt. Auch die Auswertungen der Ergebnisse nach PLX-Behandlung konnten nachweisen, dass es durch die Behandlung zu Veränderungen von Genen kommt, die mit der Stabilität der Replikationsgabel im Zusammenhang stehen, beispielweise *MRE11*, *SMARCAL1* und *MUS81*. Es liegt also die Vermutung nahe, dass BETi einen Einfluss auf die Stabilität der Replikationsgabel haben und somit die Synergie zwischen BETi und PARPi begünstigen könnten.

Aus den RNAseq-Daten geht hervor, dass es nach PLX-Behandlung neben Genexpressionsveränderungen im HR- und NHEJ-Weg auch relevante Expressionsveränderungen bei Genen gab, die für den NER-Reparaturweg relevant sind. Vor allem *POLE2* war nach PLX-Behandlung in den UCCs deutlich reduziert. Auch in den eigenen Messungen zeigte sich in einigen Zelllinien eine biologisch relevante Verminderung des *POLE2*-Gens nach PLX-Behandlung. Bisher wurde die Sensibilisierung für PARPi vornehmlich mit dem HR- und dem NHEJ-Weg in Verbindung gebracht. In einer Arbeit von Fleury et al. (2017) konnte aber gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von Genen des NER-Reparaturweges zu einem verbesserten Ansprechen der Zellen auf PARPi geführt hatte. Vor allem die Kombination aus einer HR- und einer NER-Defizienz hatte sich hier als besonders förderlich für das Ansprechen der PARPi-Monobehandlung gezeigt. Die hier dargestellten Ergebnisse könnten also darauf hinweisen, dass PLX neben der HR-Defizienz auch zu einer NER-Defizienz führt und eröffnet somit einen möglichen weiteren Erklärungsansatz, wie BETi für die Behandlung mit PARPi sensibilisieren könnten.

Abschließend soll erwähnt werden, dass es nach PLX-Behandlung keine Veränderung der Expression in den *PARP*-Genen gab. Dies lässt den Schluss zu, dass die synergistische Wirkung von PLX und dem PARPi vermutlich nicht auf den Verlust des Zielproteins zurückzuführen ist.

Fasst man die Wirkungsweisen des PARPi Olaparib und des BETi PLX zusammen, so könnte der synergistische Effekt der beiden Substanzen bei der Behandlung von UCCs durch folgende Mechanismen zustande kommen: Innerhalb der Tumorzelle kann es aufgrund ihrer genetischen Instabilität, Replikationsstress durch überaktive Proliferation oder Behandlung mit Substanzen zur Akkumulation von DNA-Schäden kommen. Beim Auftreten von SSBs wird das PARP1-Enzym zum DNA-Defekt rekrutiert. Durch Gabe eines PARPi wird das PARP1-Enzym dauerhaft an der geschädigten DNA „festgehalten“ (*PARP-Trapping*). Hierdurch kann es zu einem Zusammenbruch der Replikationsgabel kommen und folglich zu DSBs, die in erster Instanz durch die HR repariert werden können. Die Zellen werden im

Zellzyklus arretiert und gehen ggf. bei zu weitreichender Schädigung in die Apoptose. Bei gleichzeitiger Gabe des BETi PLX werden einerseits DNA-Schäden und andererseits eine künstliche HR-Defizienz induziert. Hierdurch sind die Zellen auf den alternativen NHEJ-Reparaturweg angewiesen, der jedoch durch die PARP-Inhibition nicht funktional ist und somit zu einer verstärkten Zelltodinduktion führt. Gleichzeitig kommt es durch PLX zu weiteren Genexpressionsveränderungen, die die Zelltodinduktion begünstigen. Auch eine mögliche NER-Defizienz könnte durch die Behandlung mit PLX induziert werden, die wiederum die Sensibilisierung für die Behandlung mit PARPi begünstigen könnte.

Von besonders großem Interesse ist im Zuge der Synergieanalyse auch die Beobachtung, dass die Kombinationstherapie aus PARPi und BETi bei den Cisplatin-resistenten LTTs noch bessere Resultate gezeigt hat als bei den parentalen Zelllinien. In den vorangegangenen Auswertungen der Genexpressionsanalysen konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zahlreiche Unterschiede in der Genexpression zwischen parentalen UCCs und Cisplatin-resistenten LTTs gibt. Diese wiederum können in Zusammenschau der hier gezeigten Expressionsveränderungen nach PLX-Behandlung mögliche Rückschlüsse auf das bessere Ansprechen der LTT-Zelllinien auf die Kombinationsbehandlung bieten.

Ein deutlicher Unterschied in der Genexpression zwischen den parentalen UCCs und den Cisplatin-resistenten LTTs konnte bei den Genen *MAD2L2* und *WRN* festgestellt werden. Während die beiden Gene in der PARPi-resistenten RT-112 Zelllinie stark herunterreguliert waren, konnte in der RT-112 LTT-Zelllinie eine deutliche Induktion dieser Gene gezeigt werden. Dies führte zu der Annahme, dass in den LTTs der Shieldin-Komplex wieder aufgebaut werden kann und es somit zu einer Verschiebung der DSB-Reparatur zum NHEJ-Reparaturweg kommt. Die Genexpressionsanalysen haben außerdem zeigen können, dass es durch die Behandlung mit PLX ebenfalls zu einer Überexpression der für den Shieldin-Komplex benötigten Gene kommt. Diese beiden Aspekte könnten dazu beitragen, dass PLX in den LTTs zu einem stärkeren Ansprechen auf PARPi führt als in den parentalen UCCs.

Außerdem waren auch die Genexpressionsveränderungen von *SMARCAL1*, *MRE11* und *EZH2* interessant, die bei den LTTs im Vergleich zu den UCCs identifiziert werden konnten. Diese Gene stehen im Zusammenhang mit der Stabilität der Replikationsgabel im Falle eines DNA-DSB und konnten als mögliche Faktoren für ein sensibleres Ansprechen der LTTs auf die Behandlung mit PARPi herausgearbeitet werden. Die Gene *SMARCAL1* und *MRE1* zeigten auch Expressionsveränderungen in den PLX-behandelten Zellen und könnten eine weitere mögliche Erklärung für die Mechanismen hinter der guten synergistischen Wirkung von BETi und PARPi in LTTs liefern.

Im Vergleich zu den parentalen UCCs haben die LTTs vor allem auch eine deutliche Reduktion der *ABC*-Gene *ABCB1* und *ABCG2* gezeigt. Dies könnte zu einem verminderten Drug-Efflux führen und die Substanzen damit toxischer für die LTTs machen. Nach der Behandlung der parentalen UCCs mit PLX konnte allerdings kein eindeutiger Trend bezüglich der Genexpressionsveränderung der *ABC*-Gene identifiziert werden, so dass hier allenfalls von einem begünstigenden Faktor für die toxische Wirksamkeit der Behandlung aus LTTs ausgegangen werden kann. Ein zusätzlich verminderter Drug-Efflux durch PLX konnte nicht belegt werden.

Durch die Genexpressionsanalyse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es an vielen Stellen auf molekularer Ebene mögliche Ansätze gibt, die das gute Ansprechen der Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien auf die Kombinationstherapie erklären könnte. Schlussendlich ist davon auszugehen, dass es sich um multifaktorielle Mechanismen handelt, die insgesamt den guten synergistischen Effekt der beiden Substanzen bedingen.

5.3 Nebentoxizität

Durch die Kombination mit Olaparib konnte die Dosierung von PLX so weit reduziert werden, dass diese in allen Zelllinien im Bereich der IC_{50} -Dosierung der Kontrollzelllinie HBLAK lagen (HBLAK IC_{50} für PLX = 0,6 μ M). Zwei der Zelllinien lagen nach der Reduzierung sogar unterhalb des IC_{50} -Wertes für HBLAK (T24 IC_{50} PLX nach Reduzierung = 0,5 μ M; RT-112 LTT IC_{50} PLX nach Reduzierung = 0,3 μ M). Eine solche Dosisreduzierung des BETi kann im Zuge dieser Arbeit als großer Erfolg gewertet werden, da bereits aus vorangegangenen Studien das sehr ungünstige Nebenwirkungsprofil anderer BETi bekannt ist. So musste durch Amorim et al. (2016) eine starke hämatologische und gastrointestinale Toxizität bei der Anwendung von BETi der ersten Generation in einer Phase I Studie festgestellt werden. Auch in Arbeiten zu anderen BETi wie dem JQ1-Analogen Birabresib konnte vor allem die Thrombozytopenie als dosislimitierende Nebenwirkung identifiziert werden (Lewin et al., 2018). Trotz der guten synergistischen Effekte des BETi JQ1 mit dem HDACi Romidepsin, die in Vorarbeiten gezeigt werden konnten, stellt dieses ungünstige Nebenwirkungsprofil der BETi der ersten Generation einen dosislimitierenden Faktor dar (Hölscher et al., 2018). Durch die Entwicklung der BETi der neuen Generation, wozu beispielsweise PLX gehört, konnte dieses Nebenwirkungsprofil aufgrund eines verbesserten therapeutischen Indexes deutlich verbessert werden. Die gewünschte zytotoxische Wirkung bleibt aber erhalten (Ozer et al., 2018, Thy et al., 2021). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PLX sich als Partner für eine Kombinationstherapie mit einem PARPi eignet, vor allem auch zur Behandlung der Cisplatin-resistenten LTT-Zelllinien. Denn anders als bei anderen getesteten Kombinationen, wie beispielsweise mit dem HDACi Romidepsin, zeigte sich bei den LTTs bei der Behandlung mit PLX und Olaparib auch in den niedrigen Dosisbereichen eine Synergie.

Das verbesserte Nebenwirkungsprofil, sowie die gute synergistische Wirkung machen PLX zu einem vielversprechenden Partner für die Kombinationsbehandlung Cisplatin-sensitiver und vor allem auch Cisplatin-resistenter UCCs.

Weiterhin kritisch zu betrachten sind die hohen Dosierungen des PARPi Olaparib, die zwar durch die Kombinationsbehandlung ebenfalls reduziert werden konnten, aber dennoch weit oberhalb der IC_{50} -Dosierung von HBLAK (= 9,5 μ M) lagen. Lediglich die Cisplatin-resistente Zelllinie T24 LTT konnte den HBLAK-Wert unterschreiten mit einer reduzierten Dosierung von 5,6 μ M Olaparib. In klinischen Studien hat auch die Monotherapie mit PARPi Nebenwirkungen wie Anämie, Müdigkeit, gastrointestinale Beschwerden und Neutropenie gezeigt. Dies führte beispielsweise in einer Phase III Studie mit Olaparib bei bis zu 45% der Probanden zu einer notwendigen Unterbrechung der Behandlung. Bei etwa einem Viertel der Patienten musste eine Reduzierung der Dosierung aufgrund der unerwünschten Nebenwirkungen durchgeführt werden. 10-8% der in dieser Studie behandelten Patienten mussten die Behandlung mit Olaparib vollständig beenden aufgrund der auftretenden Toxizität. Hier stellten vor allem hämatologische Nebenwirkungen wie Anämie und Neutropenie den dosislimitierenden Faktor dar (Pujade-Lauraine et al., 2017). Auch andere PARPi wie Talazoparib wurden bereits in zahlreichen klinischen Studien bezüglich ihrer Nebentoxizität untersucht. Auch hier zeigten sich vor allem hämatologische Nebenwirkung, wie Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie, aber auch Müdigkeit und Übelkeit, die zu notwendigen Dosisanpassungen oder Unterbrechungen der Behandlung führten (Hoy, 2018, Litton et al., 2018). Ein Abbruch der Behandlung war in einer Phase II Studie zum BRCA-mutierten Mammakarzinom jedoch nur bei 4% der Patienten notwendig (Turner et al., 2019).

Um den Effekt der hohen Dosierungen für PLX und Olaparib auf die Kontrollzelllinie zu untersuchen, wurden im Zuge dieser Arbeit HBLAK Zellen mit den reduzierten Dosierungen für RT-112, T24 und T24 LTT behandelt. Wie zu erwarten war, zeigte sich hier sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie eine relevante Toxizität bei der Behandlung von HBLAK. Vor allem die sehr hohen Dosierungen von RT-112 führten zu einer Zellviabilität von nur 16% bei der Monotherapie mit Olaparib und eine zusätzliche Reduzierung der Viabilität durch die Kombination mit PLX. Dennoch hat die Synergieanalyse gezeigt, dass die Kombinationsbehandlung von Olaparib und PLX bei der Kontrollzelllinie HBLAK keinen synergistischen Effekt hatte. Daraus kann man schließen, dass die beiden Substanzen Olaparib und PLX vor allem in hohen Dosierungen zwar einen zytotoxischen Effekt auf die nicht-Karzinomzelllinie haben, dass die Kombination der beiden aber keinen signifikanten synergistischen Effekt hat und somit keine zusätzliche Toxizität bewirkt.

5.4 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus einem PARPi mit einem BETi bei der Behandlung des Cisplatin-sensitiven aber vor allem auch des Cisplatin-resistenten UC zu vielversprechenden Ergebnissen geführt hat. So konnte ein synergistischer Effekt der beiden Substanzen mit Blick auf die Zellviabilität belegt und mögliche Faktoren identifiziert werden, die das positive Ansprechen der UCCs und LTTs erklären könnten. Dennoch stehen diese guten zytotoxischen Wirkungen auf die Karzinomzellen weiterhin in direktem Kontrast zu den möglichen teils dosislimitierenden Nebenwirkungen der beiden Substanzklassen. Diese Arbeit hat zeigen können, dass die Kombinationsbehandlung aus PARPi und BETi auch auf benigne Kontrollzellen eine zytotoxische Wirkung haben können, ein synergistischer Effekt, wie er bei den UCCs und LTTs zu sehen war, konnte aber nicht identifiziert werden. Daher ist es notwendig in weiteren Untersuchungen Langzeittests durchzuführen, um herauszufinden, ob benigne Zellen sich nach der Behandlung wieder stabilisieren können, während Tumorzellen weiterhin reduziert werden. Dafür sind weitere *in vitro* Studien notwendig, auch mit anderen benignen Kontrollzellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Leberzellen oder auch Kardiomyozyten, um weitreichendere toxische Nebenwirkungen auf Organe und das Herz-Kreislaufsystem zu untersuchen. Anschließend sind auch *in vivo* Testungen notwendig, sowohl im Mausmodell als auch mit Patienten, um die klinische Relevanz der Kombinationsbehandlung für Patienten mit einem fortgeschrittenen Urothelkarzinom zu validieren. Außerdem ist auch die Forschung an weiteren Kombinationsbehandlungen mit PARPi von großer Relevanz, da diese bereits in klinischem Einsatz sind und hier Erfolge in der Behandlung anderer Tumorentitäten zeigen konnten. Die klinische Relevanz für die Behandlung des fortgeschrittenen UCs gilt es also in weiteren Forschungsarbeiten zu belegen.

6 Literaturverzeichnis

- Alcitepe, İ., Salcin, H., Karatekin, İ. & Kaymaz, B. T. 2022. HDAC inhibitor Vorinostat and BET inhibitor Plx51107 epigenetic agents' combined treatments exert a therapeutic approach upon acute myeloid leukemia cell model. *Med Oncol*, 39, 257.
- Amorim, S., Stathis, A., Gleeson, M., Iyengar, S., Magarotto, V., Leleu, X., Morschhauser, F., Karlin, L., Broussais, F., Rezai, K., Herait, P., Kahatt, C., Lokiec, F., Salles, G., Facon, T., Palumbo, A., Cunningham, D., Zucca, E. & Thieblemont, C. 2016. Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with lymphoma or multiple myeloma: a dose-escalation, open-label, pharmacokinetic, phase 1 study. *Lancet Haematol*, 3, e196-204.
- Antolin, A. A., Ameratunga, M., Banerji, U., Clarke, P. A., Workman, P. & Al-Lazikani, B. 2020. The kinase polypharmacology landscape of clinical PARP inhibitors. *Sci Rep*, 10, 2585.
- Apolo, A. B., Ballman, K. V., Sonpavde, G. P., Berg, S. A., Kim, W. Y., Parikh, R. A., Teo, M. Y., Sweis, R. F., Geynisman, D. M., Grivas, P., Chatta, G. S., Reichert, Z. R., Kim, J. W., Bilen, M. A., McGregor, B. A., Srinivas, S., Halabi, S., Burbano, G. P., Morris, M. J., Rosenberg, J. E. & Oncology, A. f. C. T. i. 2024. AMBASSADOR Alliance A031501: Phase III randomized adjuvant study of pembrolizumab in muscle-invasive and locally advanced urothelial carcinoma (MIUC) vs observation. 42, LBA531-LBA531.
- Audebert, M., Salles, B. & Calsou, P. 2004. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, 279, 55117-26.
- Audeh, M. W., Carmichael, J., Penson, R. T., Friedlander, M., Powell, B., Bell-McGuinn, K. M., Scott, C., Weitzel, J. N., Oaknin, A., Loman, N., Lu, K., Schmutzler, R. K., Matulonis, U., Wickens, M. & Tutt, A. 2010. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*, 376, 245-51.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W. & Schmitz, F. 2010. *Duale Reihe: Anatomie. Vol. 2*, Georg Thieme Verlag, KG Stuttgart.
- Bahnon, R. R., Banner, B. F., Ernstoff, M. S., Lazo, J. S., Cherian, M. G., Banerjee, D. & Chin, J. L. 1991. Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 146, 1518-20.
- Bajorin, D. F., Witjes, J. A., Gschwend, J. E., Schenker, M., Valderrama, B. P., Tomita, Y., Bamias, A., Lebre, T., Shariat, S. F., Park, S. H., Ye, D., Agerbaek, M., Enting, D., McDermott, R., Gajate, P., Peer, A., Milowsky, M. I., Nosov, A., Neif Antonio, J., Jr., Tupikowski, K., Toms, L., Fischer, B. S., Qureshi, A., Collette, S., Unsal-Kacmaz, K., Broughton, E., Zardavas, D.,

- Koon, H. B. & Galsky, M. D. 2021. Adjuvant Nivolumab versus Placebo in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 384, 2102-2114.
- Balmaña, J., Tung, N. M., Isakoff, S. J., Graña, B., Ryan, P. D., Saura, C., Lowe, E. S., Frewer, P., Winer, E., Baselga, J. & Garber, J. E. 2014. Phase I trial of olaparib in combination with cisplatin for the treatment of patients with advanced breast, ovarian and other solid tumors. *Ann Oncol*, 25, 1656-63.
- Berthon, C., Raffoux, E., Thomas, X., Vey, N., Gomez-Roca, C., Yee, K., Taussig, D. C., Rezai, K., Roumier, C., Herait, P., Kahatt, C., Quesnel, B., Michallet, M., Recher, C., Lokiec, F., Preudhomme, C. & Dombret, H. 2016. Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study. *Lancet Haematol*, 3, e186-95.
- Bhattacharjee, S., Sullivan, M. J., Wynn, R. R., Demagall, A., Hendrix, A. S., Sindhwani, P., Petros, F. G. & Nadiminty, N. 2022. PARP inhibitors chemopotentiate and synergize with cisplatin to inhibit bladder cancer cell survival and tumor growth. *BMC Cancer*, 22, 312.
- Brill, E., Yokoyama, T., Nair, J., Yu, M., Ahn, Y. R. & Lee, J. M. 2017. Prexasertib, a cell cycle checkpoint kinases 1 and 2 inhibitor, increases in vitro toxicity of PARP inhibition by preventing Rad51 foci formation in BRCA wild type high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*, 8, 111026-111040.
- Brown, J. S., O'Carrigan, B., Jackson, S. P. & Yap, T. A. 2017. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov*, 7, 20-37.
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J. & Helleday, T. 2005. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434, 913-7.
- Chou, T. C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70, 440-6.
- Crabb, S. J., Hussain, S., Soulis, E., Hinsley, S., Dempsey, L., Trevethan, A., Song, Y., Barber, J., Frew, J., Gale, J., Faust, G., Brock, S., McGovern, U., Parikh, O., Enting, D., Sundar, S., Ratnayake, G., Lees, K., Birtle, A. J., Powles, T. & Jones, R. J. 2023. A Randomized, Double-Blind, Biomarker-Selected, Phase II Clinical Trial of Maintenance Poly ADP-Ribose Polymerase Inhibition With Rucaparib Following Chemotherapy for Metastatic Urothelial Carcinoma. *J Clin Oncol*, 41, 54-64.
- Curtin, N. J. 2012. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, 12, 801-17.
- Cvitkovic, E., Spaulding, J., Bethune, V., Martin, J. & Whitmore, W. F. 1977. Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model. *Cancer*, 39, 1357-61.

- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. B. 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370, 737-49.
- Dedes, K. J., Wetterskog, D., Mendes-Pereira, A. M., Natrajan, R., Lambros, M. B., Geyer, F. C., Vatcheva, R., Savage, K., Mackay, A., Lord, C. J., Ashworth, A. & Reis-Filho, J. S. 2010. PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors. *Sci Transl Med*, 2, 53ra75.
- Deutsche Krebsgesellschaft. 2021a. *Blasenkrebs: Definition und Häufigkeit* [Online]. ONKO Internetportal. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/blasenkrebs/definition-und-haeufigkeit.html> [Accessed 2024].
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2020. *Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0*, [Online]. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/Version_2.0/LL_Harnblasenkarzinom_Langversion_2.0.pdf [Accessed 16.03.2022].
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2021b. *Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.01* [Online]. Available: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/> [Accessed 29.04.2021].
- Di Micco, R., Fontanals-Cirera, B., Low, V., Ntziachristos, P., Yuen, S. K., Lovell, C. D., Dolgalev, I., Yonekubo, Y., Zhang, G., Rusinova, E., Gerona-Navarro, G., Cañamero, M., Ohlmeyer, M., Aifantis, I., Zhou, M. M., Tsigirigos, A. & Hernando, E. 2014. Control of embryonic stem cell identity by BRD4-dependent transcriptional elongation of super-enhancer-associated pluripotency genes. *Cell Rep*, 9, 234-247.
- Donati, B., Lorenzini, E. & Ciarrocchi, A. 2018. BRD4 and Cancer: going beyond transcriptional regulation. *Mol Cancer*, 17, 164.
- Drayton, R. M. & Catto, J. W. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 12, 271-81.
- Duan, M., Ulibarri, J., Liu, K. J. & Mao, P. 2020. Role of Nucleotide Excision Repair in Cisplatin Resistance. *Int J Mol Sci*, 21.
- Eastman, A. 1999. The Mechanism of Action of Cisplatin: From Adducts to Apoptosis. *Cisplatin*.
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T., Tkáč, J., Cook, M. A., Rosebrock, A. P., Munro, M., Canny, M. D., Xu, D. & Durocher, D. 2013. A cell cycle-

- dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell*, 49, 872-83.
- European Medicines Agency. 2024a. *Lynparza* [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lynparza> [Accessed 04.04.2024 2024].
- European Medicines Agency. 2024b. *Talzenna* [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/talzenna> [Accessed 04.04.2024 2024].
- Eustermann, S., Wu, W. F., Langelier, M. F., Yang, J. C., Easton, L. E., Riccio, A. A., Pascal, J. M. & Neuhaus, D. 2015. Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1. *Mol Cell*, 60, 742-754.
- Evers, B., Helleday, T. & Jonkers, J. 2010. Targeting homologous recombination repair defects in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 372-80.
- Ferri, E., Petosa, C. & McKenna, C. E. 2016. Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol*, 106, 1-18.
- Fiorentino, F. P., Marchesi, I., Schröder, C., Schmidt, R., Yokota, J. & Bagella, L. 2020. BET-Inhibitor I-BET762 and PARP-Inhibitor Talazoparib Synergy in Small Cell Lung Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 21.
- Fleury, H., Carmona, E., Morin, V. G., Meunier, L., Masson, J. Y., Tonin, P. N., Provencher, D. & Mes-Masson, A. M. 2017. Cumulative defects in DNA repair pathways drive the PARP inhibitor response in high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines. *Oncotarget*, 8, 40152-40168.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M. & Kroemer, G. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31, 1869-83.
- Gregoretto, I. V., Lee, Y. M. & Goodson, H. V. 2004. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*, 338, 17-31.
- Gstraunthaler, G. & Lindl, T. 2013. *Zell-und Gewebekultur*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., Gao, S., Wu, R., Chen, C., Li, X., Zhou, L., He, M., Li, Z., Sun, X., Jia, W., Chen, J., Yang, S., Zhou, F., Zhao, X., Wan, S., Ye, R., Liang, C., Liu, Z., Huang, P., Liu, C., Jiang, H., Wang, Y., Zheng, H., Sun, L., Liu, X., Jiang, Z., Feng, D., Chen, J., Wu, S., Zou, J., Zhang, Z., Yang, R., Zhao, J., Xu, C., Yin, W., Guan, Z., Ye, J., Zhang, H., Li, J., Kristiansen, K., Nickerson, M. L., Theodorescu, D., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Wang, J., Yang, H., Wang, J. & Cai, Z. 2011. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet*, 43, 875-8.

- Gupta, R., Somyajit, K., Narita, T., Maskey, E., Stanlie, A., Kremer, M., Typas, D., Lammers, M., Mailand, N., Nussenzweig, A., Lukas, J. & Choudhary, C. 2018. DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity. *Cell*, 173, 972-988.e23.
- Hautmann, R. & Huland, H. 2006. *Urologie*, Springer Berlin Heidelberg.
- Heinemann, A., Cullinane, C., De Paoli-Iseppi, R., Wilmott, J. S., Gunatilake, D., Madore, J., Strbenac, D., Yang, J. Y., Gowrishankar, K., Tiffen, J. C., Prinjha, R. K., Smithers, N., McArthur, G. A., Hersey, P. & Gallagher, S. J. 2015. Combining BET and HDAC inhibitors synergistically induces apoptosis of melanoma and suppresses AKT and YAP signaling. *Oncotarget*, 6, 21507-21.
- Henkels, K. M. & Turchi, J. J. 1999. Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, 59, 3077-83.
- Hoffmann, M. J., Koutsogiannouli, E., Skowron, M. A., Pinkerneil, M., Niegisch, G., Brandt, A., Stepanow, S., Rieder, H. & Schulz, W. A. 2016. The New Immortalized Uroepithelial Cell Line HBLAK Contains Defined Genetic Aberrations Typical of Early Stage Urothelial Tumors. *Bladder Cancer*, 2, 449-463.
- Hölscher, A. S., Schulz, W. A., Pinkerneil, M., Niegisch, G. & Hoffmann, M. J. 2018. Combined inhibition of BET proteins and class I HDACs synergistically induces apoptosis in urothelial carcinoma cell lines. *Clin Epigenetics*, 10, 1.
- Hoy, S. M. 2018. Talazoparib: First Global Approval. *Drugs*, 78, 1939-1946.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F. & Yao, T. P. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417, 455-8.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J. & Herskowitz, I. 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14298-302.
- Jelincic, P. & Levine, D. A. 2014. New insights into PARP inhibitors' effect on cell cycle and homology-directed DNA damage repair. *Mol Cancer Ther*, 13, 1645-54.
- Jian, W., Xu, H. G., Chen, J., Xu, Z. X., Levitt, J. M., Stanley, J. A., Yang, E. S., Lerner, S. P. & Sonpavde, G. 2014. Activity of CEP-9722, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, in urothelial carcinoma correlates inversely with homologous recombination repair response to DNA damage. *Anticancer Drugs*, 25, 878-86.
- Kais, Z., Chiba, N., Ishioka, C. & Parvin, J. D. 2012. Functional differences among BRCA1 missense mutations in the control of centrosome duplication. *Oncogene*, 31, 799-804.
- Kaletsch, A., Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Jaguva Vasudevan, A. A., Wang, C., Hansen, F. K., Wiek, C., Hanenberg, H., Gertzen, C., Gohlke, H., Kassack, M. U., Kurz, T., Schulz, W. A. &

- Niegisch, G. 2018. Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells. *Clin Epigenetics*, 10, 100.
- Karakashev, S., Zhu, H., Yokoyama, Y., Zhao, B., Fatkhutdinov, N., Kossenkov, A. V., Wilson, A. J., Simpkins, F., Speicher, D., Khabele, D., Bitler, B. G. & Zhang, R. 2017. BET Bromodomain Inhibition Synergizes with PARP Inhibitor in Epithelial Ovarian Cancer. *Cell Rep*, 21, 3398-3405.
- Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R. K., Audeh, M. W., Friedlander, M., Balmaña, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S. M., Hubert, A., Rosengarten, O., Steiner, M., Loman, N., Bowen, K., Fielding, A. & Domchek, S. M. 2015. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol*, 33, 244-50.
- Krajewska, M., Fehrmann, R. S., de Vries, E. G. & van Vugt, M. A. 2015. Regulators of homologous recombination repair as novel targets for cancer treatment. *Front Genet*, 6, 96.
- Kraywinkel, K., Fiebig, J. & Schulz, G. B. 2018. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe*, 24, 6-13.
- Kunze, D., Wuttig, D., Fuessel, S., Kraemer, K., Kotzsch, M., Meye, A., Grimm, M. O., Hakenberg, O. W. & Wirth, M. P. 2008. Multitarget siRNA inhibition of antiapoptotic genes (XIAP, BCL2, BCL-X(L)) in bladder cancer cells. *Anticancer Res*, 28, 2259-63.
- Lachapelle, S., Gagné, J. P., Garand, C., Desbiens, M., Coulombe, Y., Bohr, V. A., Hendzel, M. J., Masson, J. Y., Poirier, G. G. & Lebel, M. 2011. Proteome-wide identification of WRN-interacting proteins in untreated and nuclease-treated samples. *J Proteome Res*, 10, 1216-27.
- Lewin, J., Soria, J.-C., Stathis, A., Delord, J.-P., Peters, S., Awada, A., Aftimos, P. G., Bekradda, M., Rezai, K., Zeng, Z., Hussain, A., Perez, S., Siu, L. L. & Massard, C. 2018. Phase Ib Trial With Birabresib, a Small-Molecule Inhibitor of Bromodomain and Extraterminal Proteins, in Patients With Selected Advanced Solid Tumors. 36, 3007-3014.
- Litton, J. K., Rugo, H. S., Ettl, J., Hurvitz, S. A., Gonçalves, A., Lee, K. H., Fehrenbacher, L., Yerushalmi, R., Mina, L. A., Martin, M., Roché, H., Im, Y. H., Quek, R. G. W., Markova, D., Tudor, I. C., Hannah, A. L., Eiermann, W. & Blum, J. L. 2018. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*, 379, 753-763.
- Lord, C. J. & Ashworth, A. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481, 287-94.
- Lord, C. J. & Ashworth, A. 2016. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*, 16, 110-20.
- Lord, C. J. & Ashworth, A. 2017. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355, 1152-1158.

- Lord, C. J., Tutt, A. N. & Ashworth, A. 2015. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annu Rev Med*, 66, 455-70.
- Mahlknecht, P., Nußbaumer, B., Sommer, I. & Gartlehner, G. 2014. Subgruppeneffekte der Wirksamkeit und Sicherheit von organerhaltenden, adjuvanten und neoadjuvanten Therapien des muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase – systematische Übersichtsarbeit und Subgruppenanalyse. Available: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0380Leb_S3_Harnblasenkarzinom_2020-04.pdf [Accessed 30.03.2022].
- Mansour, W. Y., Tennstedt, P., Volquardsen, J., Oing, C., Kluth, M., Hube-Magg, C., Borgmann, K., Simon, R., Petersen, C., Dikomey, E. & Rothkamm, K. 2018. Loss of PTEN-assisted G2/M checkpoint impedes homologous recombination repair and enhances radio-curability and PARP inhibitor treatment response in prostate cancer. *Sci Rep*, 8, 3947.
- Marijon, H., Lee, D. H., Ding, L., Sun, H., Gery, S., de Gramont, A. & Koeffler, H. P. 2018. Co-targeting poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and histone deacetylase (HDAC) in triple-negative breast cancer: Higher synergism in BRCA mutated cells. *Biomed Pharmacother*, 99, 543-551.
- Mazur, P. K., Herner, A., Mello, S. S., Wirth, M., Hausmann, S., Sánchez-Rivera, F. J., Lofgren, S. M., Kuschma, T., Hahn, S. A., Vangala, D., Trajkovic-Arsic, M., Gupta, A., Heid, I., Noël, P. B., Braren, R., Erkan, M., Kleeff, J., Sipos, B., Sayles, L. C., Heikenwalder, M., Heßmann, E., Ellenrieder, V., Esposito, I., Jacks, T., Bradner, J. E., Khatri, P., Sweet-Cordero, E. A., Attardi, L. D., Schmid, R. M., Schneider, G., Sage, J. & Siveke, J. T. 2015. Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Med*, 21, 1163-71.
- Mendes-Pereira, A. M., Martin, S. A., Brough, R., McCarthy, A., Taylor, J. R., Kim, J. S., Waldman, T., Lord, C. J. & Ashworth, A. 2009. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med*, 1, 315-22.
- Meneceur, S., Grunewald, C. M., Niegisch, G. & Hoffmann, M. J. 2023. Epigenetic Priming and Development of New Combination Therapy Approaches. *Methods Mol Biol*, 2684, 259-281.
- Mio, C., Gerratana, L., Bolis, M., Caponnetto, F., Zanello, A., Barbina, M., Di Loreto, C., Garattini, E., Damante, G. & Puglisi, F. 2019. BET proteins regulate homologous recombination-mediated DNA repair: BRCAness and implications for cancer therapy. *Int J Cancer*, 144, 755-766.
- Moynahan, M. E. & Jasin, M. 2010. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 196-207.

- Murai, J., Huang, S. Y., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., Ji, J., Takeda, S. & Pommier, Y. 2012. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*, 72, 5588-99.
- Murai, J., Tang, S. W., Leo, E., Baechler, S. A., Redon, C. E., Zhang, H., Al Abo, M., Rajapakse, V. N., Nakamura, E., Jenkins, L. M. M., Aladjem, M. I. & Pommier, Y. 2018. SLFN11 Blocks Stressed Replication Forks Independently of ATR. *Mol Cell*, 69, 371-384.e6.
- Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., Aishima, S., Yao, T., Hosoi, F., Basaki, Y., Ono, M., Kuwano, M., Tanaka, M. & Tsuneyoshi, M. 2007. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep*, 18, 769-74.
- National Cancer Institute. 2021. *Romidepsin (Code C1544)* [Online]. Available: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C1544 [Accessed 04.05.2021].
- Niegisch, G., Gerullis, H., Lin, S. W., Pavlova, J., Gondos, A., Rudolph, A., Haas, G., Hennies, N. & Kramer, M. W. 2018. A Real-World Data Study to Evaluate Treatment Patterns, Clinical Characteristics and Survival Outcomes for First- and Second-Line Treatment in Locally Advanced and Metastatic Urothelial Cancer Patients in Germany. *J Cancer*, 9, 1337-1348.
- Niegisch, G., Hoffmann, M. J., Koutsogiannouli, E. A. & Schulz, W. A. 2015. Epigenetics in urothelial cancer: Pathogenesis, improving diagnostics and developing novel treatment options. *Urologe A*, 54, 526-32.
- Niegisch, G., Knievel, J., Koch, A., Hader, C., Fischer, U., Albers, P. & Schulz, W. A. 2013. Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. *Urol Oncol*, 31, 1770-9.
- Noordermeer, S. M. & van Attikum, H. 2019. PARP Inhibitor Resistance: A Tug-of-War in BRCA-Mutated Cells. *Trends Cell Biol*, 29, 820-834.
- Oshima, J., Huang, S., Pae, C., Campisi, J. & Schiestl, R. H. 2002. Lack of WRN results in extensive deletion at nonhomologous joining ends. *Cancer Res*, 62, 547-51.
- Ozer, H. G., El-Gamal, D., Powell, B., Hing, Z. A., Blachly, J. S., Harrington, B., Mitchell, S., Grieselhuber, N. R., Williams, K., Lai, T. H., Alinari, L., Baiocchi, R. A., Brinton, L., Baskin, E., Cannon, M., Beaver, L., Goettl, V. M., Lucas, D. M., Woyach, J. A., Sampath, D., Lehman, A. M., Yu, L., Zhang, J., Ma, Y., Zhang, Y., Spevak, W., Shi, S., Severson, P., Shellooe, R., Carias, H., Tsang, G., Dong, K., Ewing, T., Marimuthu, A., Tantoy, C., Walters, J., Sanftner, L., Rezaei, H., Nespi, M., Matusow, B., Habets, G., Ibrahim, P., Zhang, C., Mathé, E. A., Bollag, G., Byrd, J. C. & Lapalombella, R. 2018. BRD4 Profiling Identifies Critical Chronic Lymphocytic Leukemia Oncogenic Circuits and Reveals Sensitivity to PLX51107, a Novel Structurally Distinct BET Inhibitor. *Cancer Discov*, 8, 458-477.

- Peng, G. & Lin, S. Y. 2011. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World J Clin Oncol*, 2, 73-9.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Deenen, R., Köhrer, K., Arent, T., Schulz, W. A. & Niegisch, G. 2016a. Inhibition of Class I Histone Deacetylases 1 and 2 Promotes Urothelial Carcinoma Cell Death by Various Mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 15, 299-312.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Kohlhof, H., Schulz, W. A. & Niegisch, G. 2016b. Evaluation of the Therapeutic Potential of the Novel Isotype Specific HDAC Inhibitor 4SC-202 in Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Target Oncol*, 11, 783-798.
- Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Schulz, W. A. & Niegisch, G. 2017. HDACs and HDAC Inhibitors in Urothelial Carcinoma - Perspectives for an Antineoplastic Treatment. *Curr Med Chem*, 24, 4151-4165.
- Powles, T., Valderrama, B. P., Gupta, S., Bedke, J., Kikuchi, E., Hoffman-Censits, J., Iyer, G., Vulsteke, C., Park, S. H., Shin, S. J., Castellano, D., Fornarini, G., Li, J. R., Gümüş, M., Mar, N., Lorient, Y., Fléchon, A., Duran, I., Drakaki, A., Narayanan, S., Yu, X., Gorla, S., Homet Moreno, B. & van der Heijden, M. S. 2024. Enfortumab Vedotin and Pembrolizumab in Untreated Advanced Urothelial Cancer. *N Engl J Med*, 390, 875-888.
- Prasad, C. B., Prasad, S. B., Yadav, S. S., Pandey, L. K., Singh, S., Pradhan, S. & Narayan, G. 2017. Olaparib modulates DNA repair efficiency, sensitizes cervical cancer cells to cisplatin and exhibits anti-metastatic property. *Sci Rep*, 7, 12876.
- Pujade-Lauraine, E., Ledermann, J. A., Selle, F., GebSKI, V., Penson, R. T., Oza, A. M., Korach, J., Huzarski, T., Poveda, A., Pignata, S., Friedlander, M., Colombo, N., Harter, P., Fujiwara, K., Ray-Coquard, I., Banerjee, S., Liu, J., Lowe, E. S., Bloomfield, R. & Pautier, P. 2017. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 18, 1274-1284.
- Ramos, L., Truong, S., Zhai, B., Joshi, J., Ghaidi, F., Lizardo, M. M., Shyp, T., Kung, S. H. Y., Rezakhanlou, A. M., Oo, H. Z., Adomat, H., Le Bihan, S., Collins, C., Bacha, J., Brown, D., Langlands, J., Shen, W., Lallous, N., Sorensen, P. H. & Daugaard, M. 2023. A bi-functional PARP-HDAC inhibitor with activity in Ewing sarcoma. *Clin Cancer Res*.
- Rampias, T., Karagiannis, D., Avgeris, M., Polyzos, A., Kokkalis, A., Kanaki, Z., Kousidou, E., Tzetis, M., Kanavakis, E., Stravodimos, K., Manola, K. N., Pantelias, G. E., Scorilas, A. & Klinakis, A. 2019. The lysine-specific methyltransferase KMT2C/MLL3 regulates DNA repair components in cancer. *EMBO Rep*, 20.
- Rehm, H. & Letzel, T. 2010. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Reichert, N., Choukrallah, M. A. & Matthias, P. 2012. Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation, and development. *Cell Mol Life Sci*, 69, 2173-87.

- Robert Koch-Institut. 2021. *Krebs in Deutschland für 2017/2018* [Online]. Berlin. Available: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf?_blob=publicationFile [Accessed 2022].
- Robertson, A. G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A. D., Hinoue, T., Laird, P. W., Hoadley, K. A., Akbani, R., Castro, M. A. A., Gibb, E. A., Kanchi, R. S., Gordenin, D. A., Shukla, S. A., Sanchez-Vega, F., Hansel, D. E., Czerniak, B. A., Reuter, V. E., Su, X., de Sa Carvalho, B., Chagas, V. S., Mungall, K. L., Sadeghi, S., Pedamallu, C. S., Lu, Y., Klimczak, L. J., Zhang, J., Choo, C., Ojesina, A. I., Bullman, S., Leraas, K. M., Lichtenberg, T. M., Wu, C. J., Schultz, N., Getz, G., Meyerson, M., Mills, G. B., McConkey, D. J., Weinstein, J. N., Kwiatkowski, D. J. & Lerner, S. P. 2017. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 171, 540-556.e25.
- Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B. & Menck, C. F. M. 2018. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)*, 73, e478s.
- Rose, M., Burgess, J. T., O'Byrne, K., Richard, D. J. & Bolderson, E. 2020. PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Front Cell Dev Biol*, 8, 564601.
- Rosenberg, J. E., Park, S. H., Kozlov, V., Dao, T. V., Castellano, D., Li, J. R., Mukherjee, S. D., Howells, K., Dry, H., Lanasa, M. C., Stewart, R. & Bajorin, D. F. 2023. Durvalumab Plus Olaparib in Previously Untreated, Platinum-Ineligible Patients With Metastatic Urothelial Carcinoma: A Multicenter, Randomized, Phase II Trial (BAYOU). *J Clin Oncol*, 41, 43-53.
- Ruffner, H., Joazeiro, C. A., Hemmati, D., Hunter, T. & Verma, I. M. 2001. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 5134-9.
- Samimi, G., Safaei, R., Katano, K., Holzer, A. K., Rochdi, M., Tomioka, M., Goodman, M. & Howell, S. B. 2004. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, 10, 4661-9.
- Sanchez, R., Meslamani, J. & Zhou, M. M. 2014. The bromodomain: from epigenome reader to druggable target. *Biochim Biophys Acta*, 1839, 676-85.
- Sarnik, J., Popławski, T. & Tokarz, P. 2021. BET Proteins as Attractive Targets for Cancer Therapeutics. *Int J Mol Sci*, 22.
- Schulz, W. A. 2014. Integrating epigenetics. *Biol Chem*, 395, 1263-4.
- Schulz, W. A., Koutsogiannouli, E. A., Niegisch, G. & Hoffmann, M. J. 2015. Epigenetics of urothelial carcinoma. *Methods Mol Biol*, 1238, 183-215.

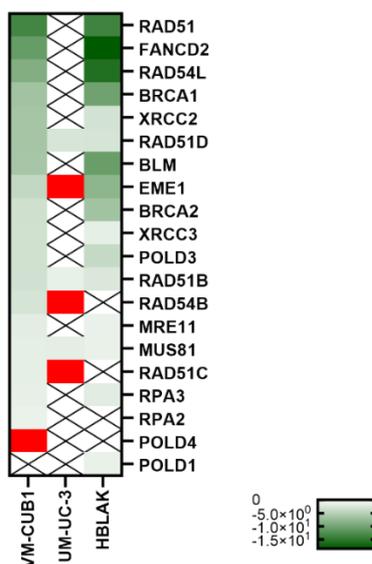
- Shamanna, R. A., Lu, H., de Freitas, J. K., Tian, J., Croteau, D. L. & Bohr, V. A. 2016. WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining. *Nat Commun*, 7, 13785.
- Skowron, M. A., Melnikova, M., van Roermund, J. G. H., Romano, A., Albers, P., Thomale, J., Schulz, W. A., Niegisch, G. & Hoffmann, M. J. 2018. Multifaceted Mechanisms of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci*, 19.
- Skowron, M. A., Niegisch, G., Albrecht, P., van Koeveringe, G., Romano, A., Albers, P., Schulz, W. A. & Hoffmann, M. J. 2017. Various Mechanisms Involve the Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like (NRF2) to Achieve Cytoprotection in Long-Term Cisplatin-Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci*, 18.
- Smith, H. L., Prendergast, L. & Curtin, N. J. 2020. Exploring the Synergy between PARP and CHK1 Inhibition in Matched BRCA2 Mutant and Corrected Cells. *Cancers (Basel)*, 12.
- Sorenson, C. M., Barry, M. A. & Eastman, A. 1990. Analysis of Events Associated With Cell Cycle Arrest at G 2 Phase and Cell Death Induced by Cisplatin. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82, 749-755.
- Sun, C., Yin, J., Fang, Y., Chen, J., Jeong, K. J., Chen, X., Vellano, C. P., Ju, Z., Zhao, W., Zhang, D., Lu, Y., Meric-Bernstam, F., Yap, T. A., Hattersley, M., O'Connor, M. J., Chen, H., Fawell, S., Lin, S. Y., Peng, G. & Mills, G. B. 2018. BRD4 Inhibition Is Synthetic Lethal with PARP Inhibitors through the Induction of Homologous Recombination Deficiency. *Cancer Cell*, 33, 401-416.e8.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- Thy, S., Hommel, A., Meneceur, S., Bartkowiak, A. L., Schulz, W. A., Niegisch, G. & Hoffmann, M. J. 2021. Epigenetic Treatment of Urothelial Carcinoma Cells Sensitizes to Cisplatin Chemotherapy and PARP Inhibitor Treatment. 13, 1376.
- Turner, N. C., Telli, M. L., Rugo, H. S., Mailliez, A., Ettl, J., Grischke, E. M., Mina, L. A., Balmaña, J., Fasching, P. A., Hurvitz, S. A., Wardley, A. M., Chappey, C., Hannah, A. L. & Robson, M. E. 2019. A Phase II Study of Talazoparib after Platinum or Cytotoxic Nonplatinum Regimens in Patients with Advanced Breast Cancer and Germline BRCA1/2 Mutations (ABRAZO). *Clin Cancer Res*, 25, 2717-2724.
- Valdez, B. C., Nieto, Y., Yuan, B., Murray, D. & Andersson, B. S. 2022. HDAC inhibitors suppress protein poly(ADP-ribosyl)ation and DNA repair protein levels and phosphorylation status in hematologic cancer cells: implications for their use in combination with PARP inhibitors and chemotherapeutic drugs. *Oncotarget*, 13, 1122-1135.

- von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J. T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Zimmermann, A. & Arning, M. 2005. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*, 23, 4602-8.
- Wade, P. A. 2001. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet*, 10, 693-8.
- Walker, M. C., Povey, S., Parrington, J. M., Riddle, P. N., Knuechel, R. & Masters, J. R. 1990. Development and characterization of cisplatin-resistant human testicular and bladder tumour cell lines. *Eur J Cancer*, 26, 742-7.
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H. & Iliakis, G. 2006. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res*, 34, 6170-82.
- Wit, M., Retz, M. M., Rödel, C. & Gschwend, J. E. 2020. The Diagnosis and Treatment of Patients With Bladder Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*, 118, 169-76.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T. & Oehme, I. 2009. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*, 277, 8-21.
- Wu, T., Pinto, H. B., Kamikawa, Y. F. & Donohoe, M. E. 2015. The BET family member BRD4 interacts with OCT4 and regulates pluripotency gene expression. *Stem Cell Reports*, 4, 390-403.
- Wu, X., Liu, D., Tao, D., Xiang, W., Xiao, X., Wang, M., Wang, L., Luo, G., Li, Y., Zeng, F. & Jiang, G. 2016. BRD4 Regulates EZH2 Transcription through Upregulation of C-MYC and Represents a Novel Therapeutic Target in Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther*, 15, 1029-42.
- Yang, L., Zhang, Y., Shan, W., Hu, Z., Yuan, J., Pi, J., Wang, Y., Fan, L., Tang, Z., Li, C., Hu, X., Tanyi, J. L., Fan, Y., Huang, Q., Montone, K., Dang, C. V. & Zhang, L. 2017. Repression of BET activity sensitizes homologous recombination-proficient cancers to PARP inhibition. *Sci Transl Med*, 9.
- Yarchoan, M., Myzak, M. C., Johnson, B. A., 3rd, De Jesus-Acosta, A., Le, D. T., Jaffee, E. M., Azad, N. S., Donehower, R. C., Zheng, L., Oberstein, P. E., Fine, R. L., Laheru, D. A. & Goggins, M. 2017. Olaparib in combination with irinotecan, cisplatin, and mitomycin C in patients with advanced pancreatic cancer. *Oncotarget*, 8, 44073-44081.
- Yin, M., Joshi, M., Meijer, R. P., Glantz, M., Holder, S., Harvey, H. A., Kaag, M., Fransen van de Putte, E. E., Horenblas, S. & Drabick, J. J. 2016. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *Oncologist*, 21, 708-15.
- Zhang, X., Zegar, T., Weiser, T., Hamdan, F. H., Berger, B. T., Lucas, R., Balourdas, D. I., Ladigan, S., Cheung, P. F., Liffers, S. T., Trajkovic-Arsic, M., Scheffler, B., Joerger, A. C., Hahn, S. A.,

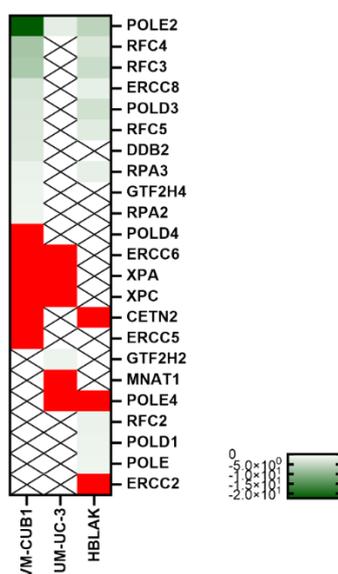
- Johnsen, S. A., Knapp, S. & Siveke, J. T. 2020. Characterization of a dual BET/HDAC inhibitor for treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 147, 2847-2861.
- Zhao, L., Okhovat, J. P., Hong, E. K., Kim, Y. H. & Wood, G. S. 2019. Preclinical Studies Support Combined Inhibition of BET Family Proteins and Histone Deacetylases as Epigenetic Therapy for Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Neoplasia*, 21, 82-92.

7 Anhang

7.1 Abbildungen



Anhang 1: Heatmap zur Darstellung der Genveränderungen der HR-Reparatur nach PLX-Behandlung. Dargestellt ist die Veränderung der Genexpression relativ zur DMSO-Kontrolle in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und HBLAK. Anhand der Grünabstufungen werden die unterschiedlich Genexpressionen visualisiert, wobei dunkelgrüne Felder eine besonders niedrige Genexpression darstellen. Das X symbolisiert keine Expressionsveränderung. Rote Felder zeigen eine Induktion der Expression.



Anhang 2: Heatmap zur Darstellung der Genveränderungen der NER-Reparatur nach PLX-Behandlung. Dargestellt ist die Veränderung der Genexpression relativ zur DMSO-Kontrolle in den Zelllinien VM-CUB1, UM-UC-3 und HBLAK. Grün = Reduktion der Genexpression (dunkel = stärkere Reduktion), X = keine Expressionsveränderung, Rot = Induktion der Genexpression.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Funktion von HDACs und HATs an Histonen	8
Abb. 2: A) Schematische Darstellung der Funktion des BET-Proteins BRD4 bei der Regulation der Transkription von Genen. B) Einfluss von BETi auf die Funktion des BRD4-Proteins.....	10
Abb. 3: Darstellung des HR- und des NHEJ-Reparaturweges nach DNA-DSB.....	14
Abb. 4: Dosiswirkungskurven nach Behandlung der parentalen und Cisplatin-resistenten UCCs sowie HBLAK mit Olaparib.....	47
Abb. 5: a) Dosiswirkungskurve der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin auf die Zelllinie 253J. b) Schematische Darstellung des Diagramms einer Chou Talalay Analyse. c) Chou Talalay Analyse der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Cisplatin	49
Abb. 6: Dosiswirkungskurven nach Behandlung der UC-Zelllinien RT-112 und T24, sowie ihre LTT-Zelllinien mit Romidepsin.....	50
Abb. 7: Chou-Talalay Analyse der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und Romidepsin..	51
Abb. 8: Dosiswirkungskurven nach Behandlung der parentalen und Cisplatin-resistenten UCCs mit PLX.....	52
Abb. 9: Chou-Talalay Analyse der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX	53
Abb. 10: Dosiswirkungskurve der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie RT-112	55
Abb. 11: Dosiswirkungskurve der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie T24.....	56
Abb. 12: Dosiswirkungskurve der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinien RT-112 LTT und T24 LTT	57
Abb. 13: Klonogenitäts-Assay zur Darstellung der Langzeitproliferationsfähigkeit der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinien RT-112 und T24 und ihr LTT-Sublinien.....	59
Abb. 14: Histogramme zur Darstellung der Auswirkung der Mono- und Kombinationsbehandlungen mit Olaparib und PLX auf den Zellzyklus.....	61
Abb. 15: Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Zellzyklusphase) nach Mono- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib und PLX im Balkendiagramm	62
Abb. 16: <i>Dot Plot</i> zur Darstellung der Auswirkung der Mono- und Kombinationsbehandlungen mit Olaparib und PLX auf die Apoptose	64
Abb. 17: Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Apoptoseinduktion) nach Mono- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib und PLX im Balkendiagramm	65
Abb. 18: Western Blot Analyse zur Validierung der Apoptoseinduktion durch die Mono- und Kombinationsbehandlung mit Olaparib und PLX auf Proteinebene.....	66

Abb. 19: a) Dosiswirkungskurve der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie HBLAK	68
Abb. 20: Balkendiagramm zur MTT-Analyse der Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie HBLAK.....	69
Abb. 21: Klonogenitäts-Assay zur Darstellung der Langzeitproliferationsfähigkeit nach Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie HBLAK	70
Abb. 22: Mikroskop-Aufnahmen der HBLAK-Kolonien nach Durchführung des Klonogenitäts-Assays nach Mono- und Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX auf die Zelllinie HBLAK.....	71
Abb. 23: Dosiswirkungskurven nach Behandlung der parentalen und Cisplatin-resistenten UCCs mit Talazoparib	72
Abb. 24: <i>Chou-Talalay</i> Analyse der Kombinationsbehandlung aus Talazoparib und PLX.....	74
Abb. 25: Veränderung der <i>RAD51</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	75
Abb. 26: Veränderung der <i>FANCD2</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination.....	76
Abb. 27: Veränderung der <i>BRCA1</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	77
Abb. 28: Veränderung der <i>BRCA2</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	77
Abb. 29: Veränderung der <i>NHEJ1</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	78
Abb. 30: Veränderung der <i>PARP1</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	79
Abb. 31: Veränderung der <i>PARP2</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	80
Abb. 32: Veränderung der <i>POLE2</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	81
Abb. 33: Veränderung der <i>POLD3</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	81
Abb. 34: Veränderung der <i>ERCC2</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	82
Abb. 35: Veränderung der <i>ERCC1</i> -Genexpression nach der Behandlung mit Olaparib, PLX und der Kombination	83
Abb. 36: Expression PARP-assoziierter Gene in den UCCs T24, RT-112, J24, VM-CUB1 und UM-UC-3	85

Abb. 37: Expression PARP-assoziiierter Gene in den Cisplatin-resistenten Zelllinien T24 LTT, RT-112 LTT und J24 LTT	87
Abb. 38: Expression PARP-assoziiierter Gene nach PLX-Behandlung in den UCCs VM-CUB1 und UM-UC-3, sowie in der Kontrolllinie HBLAK. Dargestellt sind die Genexpressionsveränderungen relativ zur jeweiligen DMSO-Kontrolle.....	89

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HDAC-Klassen und ihre Isoenzyme	7
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien	21
Tabelle 3: Erhaltungstherapie der LTT-Zelllinien	21
Tabelle 4: Materialien in der Zellkultur	22
Tabelle 5: Verwendete Zellkulturmedien	22
Tabelle 6: Verwendete pharmakologische Substanzen	22
Tabelle 7: Material für den MTT-Test	23
Tabelle 8: Material für die Giemsa- bzw. Krystallviolett-Färbung	23
Tabelle 9: Material für die RNA-Isolierung	23
Tabelle 10: Material für die reverse Transkription	23
Tabelle 11: Material für die qRT-PCR	24
Tabelle 12: Zusammensetzung qPCR Master Mix	24
Tabelle 13: Verwendete Primer	24
Tabelle 14: Material für die Protein-Isolierung	25
Tabelle 15: Material für den BCA Protein Test	25
Tabelle 16: Material für die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE	26
Tabelle 17: Material für die Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gels (Trenngel und Kammergel)	26
Tabelle 18: Material für die SDS-PAGE	26
Tabelle 19: Material für den Western Blot	26
Tabelle 20: Material für die Protein-Detektion	27
Tabelle 21: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE	27
Tabelle 22: Verwendete Primärantikörper	27
Tabelle 23: Verwendete Sekundärantikörper	28
Tabelle 24: Verwendetes Material für die FACS-Analysen Zellzyklus und Apoptose	28
Tabelle 25: Chemikalien für die Herstellung des Mastermixes zur Apoptosebestimmung	28
Tabelle 26: Chemikalien für die Herstellung des Nicoletti Puffers	28
Tabelle 27: Allgemein verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	29
Tabelle 28: Verwendete Software Programme für die Aufbereitung und Analyse der Daten	29
Tabelle 29: Zelllinien-spezifische Anzahl Zellen, die pro Well ausgesät wurden	32
Tabelle 30: Inhibitor-Konzentrationen zur Bestimmung der Zelllinien-spezifischen IC ₅₀ -Werte	34
Tabelle 31: Gemessene IC ₅₀ -Werte der einzelnen Substanzen	35
Tabelle 32: Verwendete IC ₅₀ -Werte der einzelnen Substanzen	35
Tabelle 33: Behandlungsschema für die Kombination zweier Wirkstoffe	36

Tabelle 34: Zusammensetzung eines 10%igen Polyacrylamidgels	42
Tabelle 35: Berechnung der Konzentrationen für Olaparib und Cisplatin für 253J	48
Tabelle 36: Behandlungsmatrix der Kombinationsbehandlung aus Olaparib und PLX für RT-112.....	54
Tabelle 37: Überblick über die durch die Kombinationsbehandlung erreichten Dosisreduzierungen für Olaparib und PLX.....	58
Tabelle 38: Direkter Vergleich der Zelllinien-spezifischen IC ₅₀ -Werte für Olaparib und Talazoparib.....	73

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Michèle Hoffmann, die mich vom ersten Tag an fachlich und persönlich unterstützt und gefördert hat und bei Fragen und Problemen immer zur Stelle war. Danke für die wertschätzende Zusammenarbeit. Eine bessere Betreuung hätte ich mir niemals wünschen können. Auch möchte ich meinem Zweitbetreuer Univ.-Prof. Dr. med. Günter Niegisch danken, der mit seinem fachlichen Rat dazu beigetragen hat, meine Arbeit stetig zu verbessern. Danke auch an Christiane Hader und das ganze Team des urologischen Forschungslabors für eure tägliche Unterstützung im Labor.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, die immer an mich geglaubt haben, die mich ermutigt haben, meine Träume zu verwirklichen und die mir immer den Rücken freigehalten haben. Danke auch an meine Geschwister Maria und Thomas für die bedingungslose Unterstützung, seit ich denken kann.

Ich danke Alex, der mit mir durch viele Hochs und Tiefs gegangen ist und immer fest an meiner Seite stand.

Danke an Caro, ohne die ich das Studium niemals so unbeschadet überstanden hätte.

Und danke an Janna und Anna-Laura, die mich von Anfang an darin bestärkt haben, dass ich alles schaffen kann, was ich mir vornehme. Ihr seid großartig.

Liebe Batkis, diese Arbeit ist für euch.